

ESTUDI DE LA FUNCIÓ DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ StNAC103 EN EL FEL·LEMA

Roger Verdaguer i Serrat

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/10803/668781>

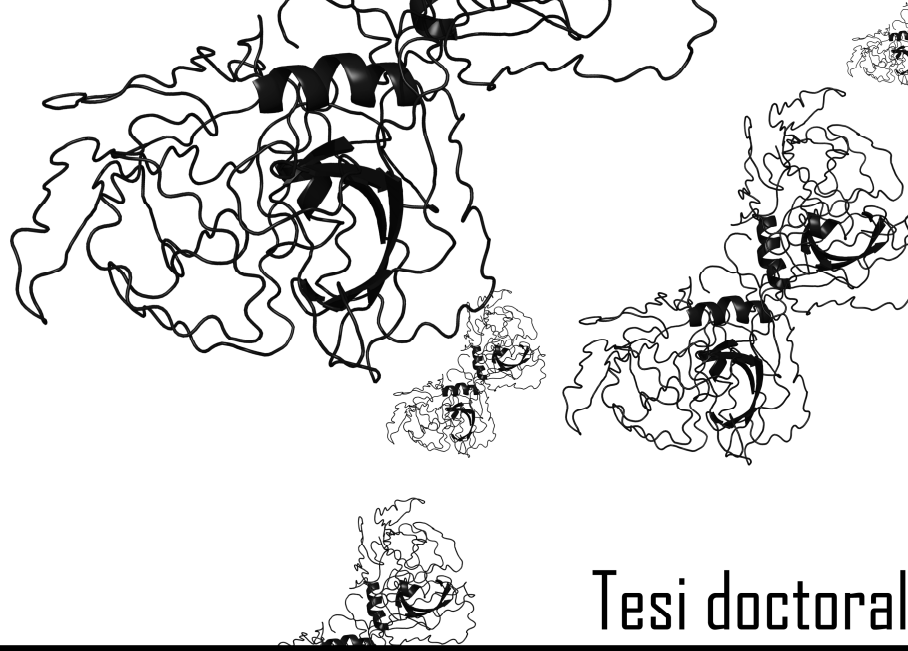
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

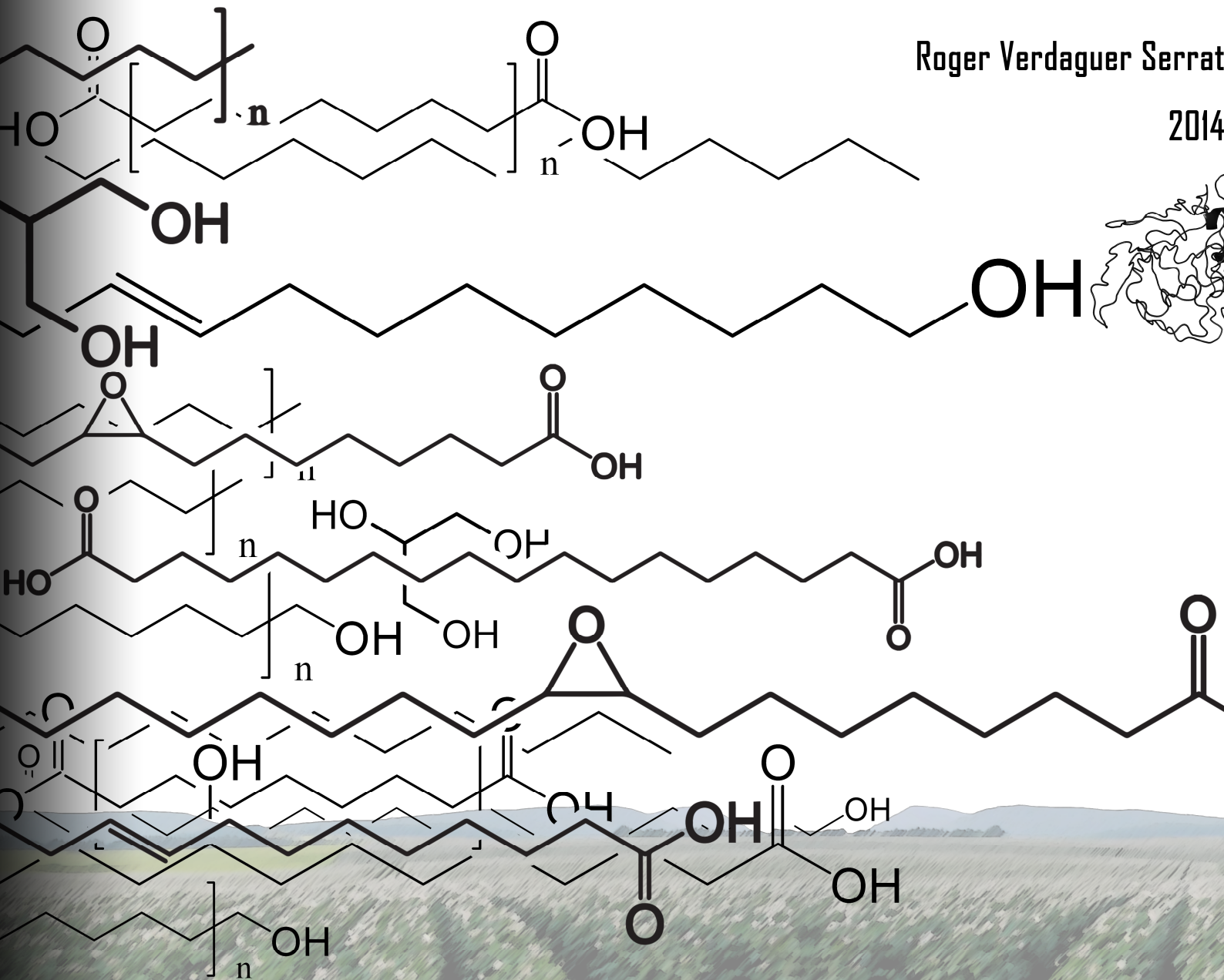


Tesi doctoral

Estudi de la funció del factor de transcripció StNAC103 en el fel·lema

Roger Verdagué Serrat

2014





Universitat de Girona

TESI DOCTORAL:

Estudi de la funció del factor de transcripció StNAC103 en el fel·lema

Memòria del treball de tesi doctoral i annexos (I-II) de Roger Verdaguer i Serrat, dipositada l'any 2014 en el Programa de doctorat en ciències experimentals i sostenibilitat, per tal d'adquirir el grau de Doctor per la Universitat de Girona.

Aquest treball s'ha realitzat al Laboratori del Suro del Departament de Biologia sota la direcció de **Mercè Figueras Vall·llosera i Marisa Molinas de Ferrer.**

Les directores de tesi

Autor

Mercè Figueras i Vall·llosera

Marisa Molinas de Ferrer

Roger Verdaguer i Serrat

Aquesta tesi s'ha dut a terme amb el suport de la Generalitat de Catalunya (Beques i Ajuts per a la formació i contractació de personal investigador novell. Convocatòria 2008 – FI 2009) i del *Ministerio de Educación y Ciencia* (projecte finançat AGL2006-07342, AGL2009-13745).

Agraïments

Perquè aquesta tesi hagi estat possible han calgut totes les circumstàncies del meu trajecte vital fins arribar aquí, si ens posem transcendents. Seria just doncs, donar gràcies per tot en un moment com aquest i així ho vull fer. Tanmateix, hi ha una sèrie de punts clau molt relacionats amb la realització de la tesi i que mereixen una menció especial. En el moment de llicenciar-me vaig intentar sense èxit enrolar-me en alguns projectes de recerca, però va ser impossible per diversos motius. Quan ja m'havia donat per vençut, vaig conèixer la Dra. Genoveva Montserrat Bueno, una persona encantadora, i que li vull agrair que em posés en contacte amb les Dres. Marisa Molinas de Ferrer i Mercè Figueras Vall-llosera, que acabarien acceptant dirigir aquesta tesi -amb tota la paciència que això ha comportat haver d'aplegar-. Gràcies també, doncs, a la Mercè i la Marisa, per haver-me donat la oportunitat de fer recerca al seu costat, aprendre d'elles, i pel seu rigor i competència en les seves funcions, així com totes les gestions extres que hem hagut de fer -l'afer dels fitotrons, l'accés a la Facultat a posteriori de la beca, etc-. Fixant-me en elles he pogut observar quines qualitats ha de tenir un bon investigador. Continuant amb el fil de la història, tinc la sensació que allò que havia de ser un projecte fàcil, o assequible, i un bon candidat a doctorand, s'han convertit en alguns moments en un os dur de rosegat. Gràcies doncs, Marisa i Mercè, per la dedicació -tinc correus vostres de les tres de la matinada-, l'esforç i la paciència. Tot seguit, al Laboratori del Suro, hi vaig conèixer l'Olga i en Marçal, que acabaven el seu doctorat i qui han representat també un exemple d'energia i intel·ligència al servei de la recerca. L'Olga a més, em va acompanyar molt en els primers temps en el laboratori, quan tot era nou per a mi, l'espai, la manera d'afrontar els experiments, algunes tècniques, etc. i li ho vull agrair fortament. I en Marçal, bé, jo he acompanyat un tros més del camí el treball que ell va començar a fer caminar i li vull agrair l'assessorament que m'ha donat en diversos moments. Després que ells es doctoressin vaig estar un temps sol. Bé, sol, sol, no ben bé. Vull dir d'estudiant de doctorat a "Can Biocel". De fet, es pot dir que vivíem tots al laboratori, que també és compartit amb les Dres. Gemma Huguet i Elisabet Kadar, a qui vull agrair la seva amabilitat sempre que he hagut de menester algun préstec de material o algun consell. També hi ha la Sara Gómez, la nostra flamant tècnic de laboratori sense qui tot es col·lapsaria més ràpid que un "àpit". Li vull donar les gràcies per facilitar-me la feina en extrem, tant al laboratori, amb la preparació de medis i tamps, com al patatòdrom per regar i ajudar en la recollida de mostres i sobretot, per aguantar la meua manera poc ortodoxa i despistada de funcionar.

Després van venir en Pau, la Maria, la Gemma i la Dolors. Gràcies a la Gemma i la Maria per la bona convivència i les bromes que fèiem al laboratori! La Dolors em va introduir al meravellós món dels químics, al passadís de dalt, on hi regnen unes lleis diferents. També li vull agrair que suportés les meves presses, preguntes impertinents i el "jo d'això no me'n fio, així no estarà bé"... Quins moments aquells, amb l'anorac i els guants, al costat del FID "i quan acabis tenca l'hidrògen que sinó explotarà tot, eh?, Roger?". I en Pau, què puc dir d'en Pau? Que és una excel·lent persona i un model a seguir. Li vull donar les gràcies pels cops de mà, els ànims, les bromes i la companyia -també en la inferioritat numèrica masculina del laboratori, que hem viscut encantadíssims-. Ah!, i per aprendre només una mica del que es pot aprendre de mi -mals hàbits i mal comportament-, i per ser el doctorand que s'hi posa més d'hora i plega més tard (...), tot sovint.

Del Laboratori del Suro també he d'agrair a l'Aïda, l'Andreu, la Núria i la Sandra que hagin agafat l'StNAC103 i l'hagin "tret a passejar una estona", fent-me sentir que aquest treball que m'he involucrat té sentit i una possible continuïtat.

Ja començava a fer agraïments de caire més sentimental i tanmateix no em vull deixar de cap dels que han contribuït de manera més tècnica en aquesta tesi. En aquest sentit, en primer lloc, donar les gràcies a les altres tècnics de laboratori del departament, la Laia, l'Imma i la Cesca, que m'han facilitat, indicat i prestat tot de coses sempre que ho he necessitat i ha estat possible, i que ho han fet amb tota la cordialitat del món. També a les secretàries que hem tingut, la Roser i la Lourdes. Tot seguit és lògic que hi entrin tots els Doctors del passadís de biologia i que no anomenaré un per un perquè són molts, que m'han facilitat l'accés als seus laboratoris -invasió de l'espai-, cessió de l'ús de maquinària i reactius -"remenar les nostres coses cares"-, préstecs de reactius, llibres, consells, m'han permès la distracció dels seus estudiants de doctorat, etc. Moltes gràcies a tots. També vull donar gràcies a

L'Enriqueta Anticó per la cessió de l'ús de material i del laboratori, i a la Dra. Salomé Prat en relació als microarrays. Agraïxo als Srs. Jordi Blavia, Carme Carulla i Dani Reyes dels Serveis Tècnics de Recerca la seva professionalitat i predisposició en el tractament de les mostres de microscòpia electrònica i l'accés a la balança de precisió per a la glamurosa tasca de pesar peles de patata. També vull agrair a l'Stéphi Gascon, la Natàlia Adell i en Miquel Jover l'assessorament en qüestions d'estadística. A l'Àlex nen, les gràcies per les proves al confocal. A la Dolors Verdaguer li agraïxo l'assessorament mentre explorava diverses opcions de recerca. Finalment també donar les gràcies a tot el personal de la universitat que en un moment o altre m'ha facilitat les gestions.

A la facultat també he compartit espai amb molts doctorands i recercadors que han anat i, a voltes, vingut i que hem conviscut i ens hem recolzat en drames vitals similars. Deuen llegir àvidament aquest apartat (a la recerca d'una satisfacció de l'ego?) abans de passar "el mamotretó" a un altre. Aquí ho teniu trempats, gràcies per aquesta companyia a tots i espero no deixar-me ningú, que és una de les grans preocupacions d'aquesta secció, donades la condició deficient i estocàstica de la meua memòria. Si us hi trobeu a faltar, no m'ho tingueu en compte, ha estat purament un error de tipus 1. D'espais comuns, la Núria, l'Àlex nena, l'Olaya, l'Anna Plasencia, la Mireia Fillol, la Vicky -per la seva simpatia i optimisme-, l'Arantza -per gaudir de ser el blanc de les meves crueltats dialèctiques-, la Sònia -per defensar-la-, l'Ari -per ajudar-me a mi contra l'Arantza, la seva estimada companya de micro-, la Jess -pel seu suport, la conversa, consells experts sobre tesis i per assegurar la salut d'espais comuns eliminant qualsevol rastre de llaminadures, excepte un perfum que es posava i que ja sabies que havia arribat-, i en Pere -qui només guanyo en un test de friquisme, no pas en gosadia, violència (?) i pràctiques perilloses amb material de laboratori, però sobretot en professionalitat; i a qui vull agrair els consells i ajuda sobre la portada, els cinematogràfics, les bromes que hem rigut, i les que no, no; i per muntar aquella matinée quan corriem el risc de quedar atrapats a la facultat durant la nevada-, l'Imma Noguerola -per les disquisicions de política-, en David Díez, en Xevi, en Pablo i la Laia. A tots gràcies per haver-me deixat muntar un petit centre recreatiu d'estudiants de doctorat a EECC, i per deixar-me dinar davant de l'ordinador quan estava baix de moral, cosa que no s'ha de fer mai. De la resta d'espais, desperdigats, zulos i demés: la Mireia López -per ser sempre tan considerada, pels post-its de "ganaaaa", "ils se lavent les dents" i per recordar-me que "avui tenim classe de francès, oi que no hi pensaves?", per renyar-me quan dinava davant de l'ordinador...-, la Mariona i l'Ariadna -per treure'm a ballar!-, la Dolors i la Montse -que són tan detallistes i bones persones-, la Sara Ramió, la Cristina, la Txell, l'Anna Vert, en Santi i la Marta petita -que sempre que els trobava parlaven de coses verdes i són gent ben alegre-, i en David Soler -per posar ordre en aquesta casa de putes, i per cantar-me "La llevantina"-, i sense deixar-me en Roger, la Clara, en Luís -tot un exemple!-, la Vero, la Glòria i l'Elena. Espero no haver deixat a ningú en evidència amb aquestes vivències que guardo amb tota l'estima, així com moltes altres. Ara bé, si fos el cas, també estic disposat a negar-ho tot rotundament.

I arribats a aquest punt em cal tornar a allò general, concretament a aquells que no estan tan directament relacionats amb la tesi però que sense ells tampoc me n'hauria sortit. Puc començar pels amics, que m'han estat un puntal imprescindible, amb els quals he crescut i que m'han acompanyat en el gaudi a muntanya, l'escalada i les partides de rol dels diumenges des d'ara ja fa mitja vida. Surten per ordre d'adveniment: en Guillem, en Joan Besalú, en Nil, en Pau, l'Edu, en Rubén, en Mau, en Dani i en Jordi. Les vostres gestes són incomptables i no caben en aquest apartat. Tot seguit ve la gent de "les estades", que també fa mitja vida que conec, que cada any pugem, si es pot, deu dies al lloc més preciós del país i mirem de dur un grapat de joves a la muntanya, a descobrir, a fer activitat, a créixer. Allà creixem i ens regenerem de les fatigues de tot l'any -això també m'ha estat imprescindible-. Gràcies per voler-m'hi. Són en Ramon, en Rafel, la Carmeta, en Santi, en Paco, els senyors doctors metges, Jordi i Maria Josep, l'Alfons, la Cristinilla Panque, l'Avi -que, com a mínim, va venir a la Terra en una longaniza-, la Mònica, l'Aram, els Ferrans, en Martí, en Carlus, en Joan Isart, en Joan Mora, l'Albert "Palo", i també els que hem coincidit menys o han vingut alguna vegada però que hem compartit i compartim coses importants, en Pitu, en Víctor, en Marc, en Bru, l'Iu, l'Atena, l'Ona...

I finalment, i de manera molt especial, les gràcies a la família. A l'Ester, per la mirada que em regala i l'amor que em dona, pels seus ànims i, en referència a la tesi, per la paciència enorme que ha tingut en les esperes(...). Al pare i la mare, que sempre m'han animat en tot, a continuar estudiant i avançant, i m'han ofert tot el que tenien perquè pogués ser així. I també als avis perquè quan mires d'on vens, els teus ulls acaben allà i quan mires a on vas proves de tenir present els aprenentatges que te n'arriben.

Continguts

Agraïments	1
Continguts	3
Índex de figures	7
Índex de taules	8
Abreviatures	9
Resum	13
Summary	15
Resumen	17
Introducció general	19
FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ	21
<u>La família NAC</u>	<u>22</u>
<i>Origen filogenètic i distribució</i>	22
<i>Diversitat funcional de les proteïnes NAC</i>	25
<i>Regulació dels factors de transcripció NAC</i>	28
<i>La família NAC a les Solanàcies</i>	28
EL PERIDERMA I EL FEL-LEMA	29
LA SUBERINA I LES CERES	31
<u>Característiques químiques i composició</u>	<u>31</u>
<u>Biosíntesi i organització macromolecular</u>	<u>36</u>
<u>Funció de barrera de la suberina i les ceres del periderma</u>	<u>39</u>
IDENTIFICACIÓ D'UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ NAC EXPRESSAT DIFERENCIALMENT EN SURO	40
EL MODEL DE PATATERA PER A L'ESTUDI DE TEIXITS SUBERITZATS	41
Objectius	45
Capítol 1 StNAC103: el gen i la proteïna	51
<u>Sumari</u>	<u>51</u>
<i>Objectiu</i>	51
<i>Metodologia</i>	51
<i>Resultats i conclusions</i>	51
1.1.INTRODUCCIÓ	53

1.2. MATERIAL I MÈTODES	55
<u>Bases de dades i eines bioinformàtiques</u>	<u>55</u>
<u>Construcció d'un filograma en relació a StNAC103</u>	<u>56</u>
1.3. RESULTATS	57
<u>Seqüència del gen: Promotor i ORF</u>	<u>57</u>
<u>Estructura del gen</u>	<u>64</u>
<u>Seqüència proteica i anàlisi de motius</u>	<u>65</u>
<u>Homologia i filogènia</u>	<u>71</u>
<i>Comparació d'StNAC103 amb les proteïnes més homòlogues de Solanàcies, Vitis i Pollancre</i>	73
1.4. DISCUSSIÓ	80
Capítol 2 Anàlisi química, estructural i de transpiració del periderma modificat per StNAC103	83
<u>Sumari</u>	<u>83</u>
<i>Objectiu</i>	83
<i>Metodologia</i>	83
<i>Resultats i conclusions</i>	83
2.1. INTRODUCCIÓ	85
2.2. MATERIAL I MÈTODES	88
<u>Material biològic</u>	<u>88</u>
<u>Obtenció de les "membranes de periderma" per a les anàlisis</u>	<u>88</u>
<u>Anàlisi gravimètrica de la permeància hídrica</u>	<u>89</u>
<u>Anàlisi de suberina i ceres</u>	<u>90</u>
<i>Extracció de les ceres</i>	90
<i>Extracció dels compostos esterificats de la suberina</i>	90
<i>Derivatització amb BSTFA (N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide)</i>	91
<i>Identificació i quantificació dels components extrets de suberina i ceres</i>	91
<u>Microscòpia</u>	<u>92</u>
<u>Tests estadístics</u>	<u>93</u>
2.3. RESULTATS	94
<u>Anàlisi de l'acumulació de transcrit d'StNAC103 en les línies silenciades</u>	<u>94</u>
<u>Efectes de la sobreexpressió d'StNAC103 en la permeància del periderma</u>	<u>95</u>
<u>Efectes d'StNAC103 en el perfil de lípids del periderma</u>	<u>97</u>
<i>Efectes de la sobreexpressió</i>	97
<i>Efectes del silenciament</i>	100
• Efectes del silenciament (específic i conservat) a les ceres	100
• Efectes del silenciament (específic i conservat) a la suberina	106
<u>Efectes del silenciament d'StNAC103 en l'anatomia microscòpica i l'ultraestructura del periderma</u>	<u>114</u>

2.4. DISCUSSIÓ	115
<u>StNAC103 inhibeix l'acumulació de suberina i ceres i afecta a la composició química de ceres i suberina del periderma</u>	<u>115</u>
<u>StNAC103 no té efectes en l'organització del fel·lema, la disposició lamel·lar de la paret de suberina ni en la permeància hídrica del periderma</u>	<u>119</u>
Capítol 3 Expressió tissular i coexpressió d'StNAC103	123
<u>Sumari</u>	<u>123</u>
<i>Objectiu</i>	123
<i>Metodologia</i>	123
<i>Resultats i conclusions</i>	123
3.1. INTRODUCCIÓ	125
3.2. MATERIAL I MÈTODES	127
<u>Condicions de cultiu</u>	<u>127</u>
<u>Determinació de l'abundància relativa de transcrit per mitjà d'RT-PCR</u>	<u>127</u>
<i>Extracció d'RNA pel mètode de Z6</i>	127
• Precaucions al treballar amb RNA	127
• Protocol	128
<i>Digestió DNasa lliure d'RNases (RNase-free)</i>	129
<i>Electroforesi d'RNA en gel de formaldehid</i>	129
<i>Síntesi de cDNA</i>	130
<i>Quantificació per PCR a temps real</i>	130
<u>Generació de plantes transgèniques ProStNAC103::GUS-GFP</u>	<u>132</u>
<i>Disseny d'encebadors per tal d'obtenir el promotor d'StNAC103</i>	132
<i>Extracció de DNA genòmic</i>	133
<i>Amplificació del promotor d'StNAC103 i clonació en el sistema Gateway</i>	133
<i>Transformació d'Agrobacterium tumefaciens</i>	136
• Obtenció de cèl·lules competents d' <i>A. tumefaciens</i> . Soca GV2260 i LBA4404 (EHA)	136
• Transformació d' <i>A. tumefaciens</i>	136
<i>Transformació de fulla de patatera (ssp. andigena)</i>	136
<i>Detecció d'activitat del promotor d'StNAC103</i>	137
<u>Bases de dades</u>	<u>138</u>
3.3. RESULTATS	139
<u>Anàlisi in silico a nivell d'expressió i interacció amb altres proteïnes</u>	<u>139</u>
<i>Patró d'expressió in silico</i>	139
<i>Anàlisi in silico de coexpressió</i>	140
<u>Expressió en teixits nadius de patatera</u>	<u>147</u>
<i>Anàlisi d'acumulació relativa de transcrit</i>	147

<i>Activitat del promotor d'StNAC103 en teixits natus</i>	149
<u>Expressió en teixits cicatricials</u>	154
<u>Perfil temporal d'acumulació de transcrit d'StNAC103 en teixits cicatricials</u>	155
<u>Anàlisi de l'activitat del promotor d'StNAC103 en tubercle ferit</u>	161
3.4. DISCUSSIÓ	162
<u>Expressió d'StNAC103 i els teixits suberitzats</u>	162
<u>Co-expressió d'StNAC103 amb gens de biosíntesi de suberina durant la cicatrització</u>	164
Discussió general	167
LA REGULACIÓ DEL PERIDERMA I ELS TEIXITS SUBERITZATS	169
FUNCIÓ FISIOLÒGICA D'STNAC103	170
REGULACIÓ I ACTIVITAT MOLECULAR D'STNAC103	171
PERSPECTIVES FUTURES	172
Conclusions generals	175
Bibliografia	179
Annexos	195
ANNEX I: NIVELLS DE SIGNIFICACIÓ DE L'ANÀLISI ESTADÍSTICA DE CERES I SUBERINA	197
ANNEX II: TAULA D'ENCEBADORS UTILITZATS	208

Índex de figures

Introducció general

Figura 1 Filograma de proteïnes NAC de patatera, Arabidopsis i arròs extret del treball de Singh et al (2013).....	24
Figura 2 Estructura del periderma de tubercle de patata.....	30
Figura 3 Model de l'estructura macromolecular de la suberina segons Graça i Santos (2007)	33
Figura 4 Esquema dels processos de biosíntesi de suberina i ceres	37

Capítol 1 StNAC103: el gen i la proteïna

Figura 5 Alineament de les seqüències nucleotídiques (promotor i ORF) d' <i>StNAC103</i> i el seu possible ortòleg a <i>Solanum tuberosum</i> Grup Phureja (Sp) i traducció aminoacídica de la seqüència d' <i>StNAC103</i>	57
Figura 6 Seqüència proteica del domini NAC d' <i>StNAC103</i> amb els subdominis A-E indicats.....	64
Figura 7 Predicció de l'estructura terciària i secundària d' <i>StNAC103</i>	67
Figura 8 Filograma d' <i>StNAC103</i> i els seus possibles ortòlegs, els membres del grup II-3 de NACs d' <i>Arabidopsis</i> , alguns membres del grup III-2 (ANAC029) i III-3 (ANAC002, ANAC072), i proteïnes els cDNAs de les quals mostren 0 malaparellaments en la seqüència nucleotídica de l'RNAi del silenciament conservat	72
Figura 9 Comparativa de motius conservats entre diversos gens NAC.....	76
Figura 10 Identificació i localització de motius conservats en la seqüència d' <i>StNAC103</i>	76
Figura 11 Motius específics del grup NAC-c de factors de transcripció NAC de patatera que conté <i>StNAC103</i>	78
Figura 12 Alineament de les seqüències proteiques d' <i>StNAC103</i> i el seu ortòleg de Q. suber	78

Capítol 2 Anàlisi química, estructural i de transpiració del periderma modificat per *StNAC103*

Figura 13 Abundància Relativa de Transcrit (RTA) d' <i>StNAC103</i> en les línies transformades respecte al gen constitutiu EF1 α	94
Figura 14 Permeància dels peridermes de les línies de sobreexpressió i control.....	96
Figura 15 Efectes de la sobreexpressió d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de ceres del periderma.....	98
Figura 16 Efectes de la sobreexpressió d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de la suberina del periderma	99
Figura 17 Efectes del silenciament d' <i>StNAC103</i> en la càrrega total de lípids i les classes de substàncies de les ceres	101
Figura 18 Efectes del silenciament d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de ceres del periderma	101
Figura 19 Efectes del silenciament específic d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de ceres del periderma	104
Figura 20 Efectes del silenciament conservat d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de ceres del periderma.....	105
Figura 21 Efectes del silenciament d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de la suberina del periderma	109
Figura 22 Efectes del silenciament específic d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de suberina del periderma	110
Figura 23 Efectes del silenciament conservat d' <i>StNAC103</i> en el perfil lipídic de suberina del periderma	111
Figura 24 Increment en percentatge de la quantitat de cada substància de les ceres en les plantes silenciades, respecte el control.....	112
Figura 25 Increment en percentatge de la quantitat de cada monòmer de suberina en les plantes silenciades, respecte el control.....	113
Figura 26 Ultraestructura de la paret cel·lular suberitzada en peridermes de patata de plantes amb silenciament conservat i control	114

Capítol 3 Expressió tissular i coexpressió d'*StNAC103*

Figura 27 Clonatge del promotor d' <i>StNAC103</i> dins el vector pKGWFS7.....	135
Figura 28 Patró d'expressió tissular d' <i>StNAC103</i>	142

Figura 29 Abundància relativa de transcrit (RTA) d' <i>StNAC103</i> en teixits constitutius	148
Figura 30 Patró de tinció per GUS al periderma del tubercle	150
Figura 31 Localització de l'activitat del promotor d' <i>StNAC103</i> al fel-lema	150
Figura 32 Fragment de fel-lema aïllat per observar l'activitat del promotor.....	151
Figura 33 Patró de tinció per GUS al periderma lenticel·lar	152
Figura 34 Patró de tinció per GUS en arrel de patata	154
Figura 35 Evolució de l'acumulació relativa de transcrit d' <i>StNAC103</i> , <i>CYP86A33</i> i <i>FHT</i> en tubercle ferit.....	156
Figura 36 Acumulació relativa de transcrit en fulla ferida en una escala temporal.....	158
Figura 37 Acumulació relativa de transcrit en fulla ferida en diagrama de barres	159
Figura 38 Abundància Relativa de Transcrit d' <i>StNAC103</i> en fulla ferida	160
Figura 39 Patró de tinció per GUS en tubercle ferit.....	160

Índex de taules

Introducció general

Taula 1 Percentatges relatius de cada classe de monòmer de la suberina en peridermes de tubercle de patata	34
Taula 2 Variació en la composició de la suberina en 16 plantes.....	35

Capítol 1 StNAC103: el gen i la proteïna

Taula 3 Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d' <i>StNAC103</i> (-2276b).....	63
Taula 4 Possibles localitzacions de modificació post-transcripcional dins la proteïna <i>StNAC103</i>	70
Taula 5 Homòlegs d' <i>StNAC103</i> a <i>S. tuberosum</i> , <i>S. lycopersicum</i> i <i>N. benthamiana</i>	74

Capítol 2 Anàlisi química, estructural i de transpiració del periderma modificat per *StNAC103*

Taula 6 Gens reguladors de la síntesi de ceres	121
--	-----

Capítol 3 Expressió tissular i coexpressió d'*StNAC103*

Taula 7: Gens que es coexpressen amb <i>ANAC058</i>	145
---	-----

Annexos

Taula 8: Anàlisi de substàncies de les ceres per línies separades	199
Taula 9: Anàlisi de substàncies de les ceres per tipus de transformació	200
Taula 10: Anàlisi dels totals de les substàncies de les ceres per tipus de transformació.....	201
Taula 11: Anàlisi de substàncies de la suberina per línies separades	204
Taula 12: Anàlisi de substàncies de la suberina per tipus de transformació	206
Taula 13: Anàlisi dels totals de les substàncies de la suberina per tipus de transformació.....	207
Taula 14: Taula d'encebadors utilitzats en aquesta tesi	208

Abreviatures

Escala de magnituds

K	quilo
m	mili
μ	micro
e	exponencial (e=×10 ^x)
X	vegades (Ex: 10X, concentrat 10 vegades)

Unitats i magnituds

%	tant percent
b	bases (sempre que vagi després d'un número)
cal	calories
Da	Daltons
E	eficiència
°C	graus centígrads
g	grams
h	hores
ΔG	Increment d'energia
l	litres
m	metres
min	minuts
mol	mols
M	molar
p	probabilitat
pb	parells de bases
p/v	pes/volum
R ²	Coefficient de regressió
rpm	revolucions per minut
s	segons
sec	segons
TR	traces
V	volts
v	volums
w/v	<i>weight/volume</i> (pes/volum)

Sigles i abreviatures

2MS	medi Murashige & Skoog suplementat al 2 % (pes/volum) amb sacarosa
3'	extrem 3 prima
5'	extrem 5 prima
8MS	medi Murashige & Skoog suplementat al 8 % (pes/volum) amb sacarosa
aa	aminoàcids
ABA	àcid abscísic
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i> (proteïna)
Aprt	<i>adenine phosphoribosyl transferase</i>
ASFT	<i>Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase</i>
AP2/ERF	<i>Apetala 2/Ethylene-Responsive Element Binding Factors</i> (proteïna)
ATAF	<i>Arabidopsis Transcription Activation Factor</i> (proteïna)
AUX	Auxina
B3	Domini d'unió a DNA
BAP	benzil adenina
BF ₃	Trifluorur de bor
BDG	<i>Bodyguard</i> (proteïna alfa/beta hidrolasa)
BIHD	<i>Biotic and Abiotic Homeodomain Protein</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i> (tècnica)

BLASTP	<i>protein-protein <u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
bZIP	<i>Basic Leucine <u>Z</u>ipper Domain Protein</i>
Ca	banda de Caspary
cAMP	<i>Cyclic Adenosine <u>M</u>onophosphate</i> (fosfat d'adenosina cíclic)
CaMV	<i>Cauliflower <u>M</u>osaic <u>V</u>irus</i> (virus del mosaic del tabac)
CASTing	<i>Cyclic <u>A</u>mplification and <u>S</u>election of <u>T</u>argets</i> (mètode)
cDNA	àcid desoxiribonucleic complementari
CELD	<i>Cellulase <u>D</u> 6×His</i> (mètode)
CER	<i>Eceriferum</i> (proteïna)
CesaA	<i>Cel·lulosa sintasa <u>A</u></i>
CIM	<i>Callus <u>I</u>nduction <u>M</u>edium</i> (medi d'inducció de call)
CL	<i>Closing <u>L</u>ayer</i> (capa de tancament de la ferida)
Clf	Claforan
CLF	<i>Curly <u>L</u>eaf <u>F</u>lag</i> (proteïna)
Co	parènquima cortical
CP	<i>Coat <u>P</u>rotein</i> (proteïna)
C _t	<i>Cycle <u>t</u>hreshold</i> (Cicle en el qual la Real Time PCR sobrepassa el llindar de detecció establert)
cv	<i>cultivar variant</i> (varietat de cultiu)
CYP	<i>Cytochrome <u>P</u>450</i> (proteïna)
DAISY	<i>Ketoacyl CoA synthase 2</i> (KCS2)
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DMTU	<i>Dimethylthiourea</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfòxid)
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNasa	desoxiribonucleasa
DO	densitat òptica
Dof	<i>DNA-Binding With <u>O</u>ne <u>F</u>inger</i> (proteïna)
dsDNA	<i>double stranded <u>D</u>N</i> A (DNA de doble cadena)
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Disodium ethylenediaminetetra-acetate•H₂O</i>
EF1α	<i>Elongation <u>F</u>actor <u>1</u>α</i> (Factor d'elongació 1α)
EMBL	<i>European <u>M</u>olecular <u>B</u>iology <u>L</u>aboratory</i>
En	Endodermis
EST	<i>Expression <u>S</u>equences <u>T</u>ag</i> (marca o marcador de seqüència expressada)
Ex	Exodermis
FACT	<i>Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA <u>C</u>affeoyl <u>T</u>ransferase</i>
FAE	<i>Fatty Acid <u>E</u>longation <u>C</u>omplex</i> (complex d'elongació d'àcids grassos)
FAR	<i>Fatty Acid <u>R</u>eductase</i> (reductasa d'àcids grassos)
FBW7	<i>F-Box/<u>W</u>D Repeat-Containing protein <u>Z</u></i> (proteïna)
FDH	<i>Fiddlehead</i> (proteïna KCS)
FHA	<i>Forkhead <u>A</u>ssociated <u>D</u>omain</i> (domini present en proteïnes reguladores)
FHT	<i>Feruloyl <u>T</u>ransferase</i> d'ω-hidroxiàcids
frw	<i>forward</i> (directe, referit a encebadors)
GA	Gibberel·lina
GC-FID	<i>Gas <u>C</u>hromatography - <u>F</u>lame <u>I</u>onization <u>D</u>etector</i> (cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama)
GC-MS	<i>Gas <u>C</u>hromatography - <u>M</u>ass <u>S</u>pectrometer</i> (cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses)
GCM	<i>Glial <u>C</u>ells <u>M</u>issing</i> (proteïna)
GDSL	proteïna amb capacitat esterasa/lipasa, de la família que conté el motiu GDSL
GUS	β-glucuronidasa
GFP	<i>Green <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i> (proteïna verd-fluorescent)
GPAT	<i>Glycerol-3-<u>P</u>hosphate <u>A</u>cyltransferase</i> (proteïna)
GPP	<i>General <u>P</u>henylpropanoid <u>P</u>athway</i> (via general dels fenilpropanoides)
GRAB	<i>Geminivirus <u>R</u>ep <u>A</u> <u>B</u>inding</i> (proteïna)
GRP	<i>Glicine <u>R</u>ich <u>P</u>rotein</i>
HDG	<i>Homeodomain <u>G</u>labrus</i> (proteïna HD-ZIP de classe IV)
HD-ZIP	<i>Homeodomain-Leucine <u>Z</u>ipper</i> (proteïna)
His	Histidina
HPRP	<i>Hydroxyprolyne <u>R</u>ich <u>P</u>rotein</i>
IRX	<i>Irregular <u>X</u>ylem</i> (proteïna)

JA	àcid jasmònic
Kan	Kanamicina
KCS	<i>β-ketoacyl-CoA synthase</i> (proteïna)
KEN box	caixa lisina - àcid glutàmic - asparagina
LACS	<i>Long-Chain Acyl-CoA Synthetases</i>
LCFA	<i>Long Chain Fatty Acids</i> (àcids grassos de cadena llarga)
ln	logaritme neperià
LTP	<i>Lipid Transfer Protein</i> (Proteïna de transferència de lípids)
MATE	<i>Multidrug And Toxic Compound Extrusion</i> (Extrusió de compostos tòxics i múltiples drogues - família de proteïnes d'eflux-)
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
miRNA	àcid ribonucleic micro
miRNAoma	conjunt de miRNAs d'un genoma
mRNA	àcid ribonucleic missatge
MS	medi Murashige & Skoog
MYB	<i>Myeloblastosis</i> (família de factors de transcripció)
NAC	<i>No Apical Meristem, ATAF, CUC Transcription Factors</i> (proteïna)
NACR	<i>NAC Recognition Sequence</i> (seqüència reconeguda per proteïnes NAC)
NAM	<i>No Apical Meristem</i> (proteïna)
NAMT	<i>Nicotinic Acid Carboxyl Methyltransferase</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i> (senyal o seqüència que marca l'exportació fora de nucli)
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> (senyal o seqüència que indica la importació a nucli)
NO	<i>NAM Overexpression</i> (sobreexpressió d'StNAC103)
ns	no significatiu (en referència al resultat d'un test estadístic)
NST	<i>NAC Secondary Wall Thickening Promoting Factor</i> (proteïna)
NSC	NAM silenciament conservat (silenciament conservat d'StNAC103)
NSE	NAM silenciament específic (silenciament específic d'StNAC103)
NTC	<i>Non Template Control</i> (control sense motlle en la Real Time PCR)
OD _x	<i>Optical Density at x nm</i> (Densitat òptica a una longitud d'ona d' <i>x nm</i>)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (pauta de lectura oberta)
Pa	Parènquima
PAL	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase</i>
Ph	Fel-lema
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
PDLP	<i>Plasmodesmata located protein</i>
PELPK	prolina-àcid glutàmic-leucina-prolina-lisina (en referència a les proteïnes que contenen aquest motiu)
Pin	<i>Protein Interacting With Never In Mitosis Gene A</i> (proteïna)
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i> (proteïna)
ProStNAM002:GUS- StNAM002	fusió del promotor d'StNAC103 amb GUS
PRP	<i>Pathogenesis Related Protein</i>
PTFE	<i>Polytetrafluoroetileno</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i> (PCR quantitativa)
RD26	<i>Responsive to Desiccation 26</i> (proteïna)
Rep	<i>Geminivirus replication enhancer</i> (proteïna)
rev	<i>reverse</i> (invers, referit a encebadors)
RBSDV	<i>Rice Black Streak Dwarf Virus</i> (virus)
RCF2/CPL1	<i>Regulators of C-Repeat Binding Factor 2 / C-Terminal Domain Phosphatase-Like 1</i> (proteïna)
RDV	<i>Rice Dwarf Phytoreovirus</i> (virus)
Rf	rifampicina
RGSV	<i>Rice Grass Stunt Virus</i> (virus)
RIM1	<i>Reduced in Inoculated Mutant 1</i> (proteïna)
RING-finger	<i>Really Interesting New Gene</i> finger (proteïna)
RMN	ressonància magnètica nuclear
Rn	<i>normalized reporter</i> (delator normalitzat de la Real Time PCR, o llindar de detecció de la fluorescència)
RNA	àcid ribonucleic
RNAi	àcid ribonucleic d'interferència
RNasa	ribonucleasa
RNAseq	seqüenciació de l'RNA
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espècies reactives de l'oxigen)
rRNA	àcid ribonucleic ribosòmic

RRSV	<i>Rice ragged Stunt Oryza virus</i> (virus)
RT	retrotranscripció
RT-	Control negatiu de la Real Time PCR, sense polimerasa
RT+	Control positiu o calibrador de la Real Time PCR
RTA	<i>Relative Transcript Abundance</i> (Abundància relativa de transcrit))
RTSV	<i>Rice Tungro Spherical Virus</i> (virus)
RSV	<i>Rice Stripe Virus</i> (virus)
SA	<i>Salicylic Acid</i> (àcid salicílic)
SBP	<i>Squamosa Promoter Binding Protein</i> (proteïna)
SCF	<i>S-Phase Kinase-Associated protein 1 Cullin F Box</i> (proteïna)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (detergent)
SENU	<i>Senescence Up-Regulated</i> (proteïna)
SGS	<i>Suppressor of Gene Silencing</i> (proteïna)
SHN	<i>Shine</i> (proteïna)
SIM	<i>Shoot Induction Medium</i> (medi d'inducció de call)
SND	<i>Secondary Wall-Associated NAC Domain</i> (protein)
SNRK1	<i>Sucrose Non-Fermenting 1-Related Protein Kinase-1</i> (proteïna)
Sp	espectinomicina
St	Estreptomicina
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (DNA de monocadena)
SSH	<i>Suppression Subtractive Hybridization</i> (llibreria d'hibridació substractiva de supressió)
ssp	subespècie
TAR	<i>Transcription Activation Region</i> (domini d'activació de la transcripció)
TCV	<i>Turnip Crinckle Virus</i> (virus)
TDNA	àcid desoxiribonucleic de transferència (del plasmidi inductor de tumors d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (microscòpia de transmissió d'electrons)
TF	<i>Transcription Factor</i> (factor de transcripció)
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TIP	<i>Turnip Crinkle Virus Interacting Protein</i>
TLCV	<i>Tomato Leaf Curl Virus</i> (virus de la fulla enroscada del tomàquet)
TMS	<i>Trimethylsilyl</i>
tRNA	àcid ribonucleic de transferència
UDP-glicosiltransferase	<i>Uridine diphosphate glucose glycosyltransferase</i>
UPF	<i>Uncharacterised Protein Family</i>
USP	<i>Ubiquitin Specific Protease</i> (proteïna)
UV	ultraviolada
VLCFA	<i>Very Long Chain Fatty Acids</i> (àcids grassos de cadena molt llarga)
VND	<i>Vascular Related NAC Domain Protein</i> (proteïna)
WIN	<i>Wax Inducer</i> (proteïna)
WND	<i>Poplar Wood-Associated NAC Domain Transcription Factors</i> (proteïna)
WRI	<i>Wrinkled</i> (factor de transcripció Wrinkled)
WRKY	Factor de transcripció amb el motiu triptòfan - arginina - lisina - tirosina
wt	<i>wild type</i> (salvatge)
WUS	<i>WUSCHEL-Related Homeobox Protein Family</i> (proteïna)
XCP	<i>Xylem Cystein Proteinase</i> (proteïna)
Xy	xilema
ZIP	<i>Zipper protein</i> (proteïna amb el domini zipper)

Resum

Els factors de transcripció NAC són específics de plantes i una de les famílies més nombroses i més àmpliament distribuïdes en el regne vegetal. Han estat identificats des dels briòfits a les angiospermes i amb una diversificació creixent que actualment s'ha vist que pot arribar a 200 gens en una sola espècie. La família NAC de factors de transcripció realitza funcions tan diverses com l'establiment de meristemes, la resposta a senescència, la morfogènia o la resposta a l'estrès i a virus. Un d'aquests gens NAC es va identificar en surera com a bon candidat de la regulació de la suberina ja que, en comparacions de transcriptomes i perfils d'acumulació de transcrit, es va observar que el gen s'indueix de forma preferent en teixits suberitzats. Prèviament a aquesta tesi es van obtenir línies de patatera transgèniques, sobreexpressants i silenciades per l'ortòleg de surera en patatera, anomenat *StNAC103*. Per al silenciament d'*StNAC103* es van realitzar dues construccions: una dirigida a una regió específica del gen (línies transformades designades NSE) i l'altra contra una regió conservada de la família NAC (línies transformades NSC).

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat entendre millor el paper d'*StNAC103* en els teixits suberitzats i és per això que s'ha analitzat els efectes fenotípics del silenciament/sobreexpressió d'*StNAC103* en aspectes bàsics per al funcionament del periderma com són la composició química de suberina i ceres, la ultraestructura de la paret cel·lular suberificada i la permeància del periderma. L'anàlisi química s'ha realitzat mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un detector de ionització de flama (GC-FID) per tal de quantificar cadascun dels tipus de molècules provinents dels extractes de suberina i ceres. S'observa que les línies silenciades per *StNAC103* presenten un augment significatiu en la deposició de suberina i ceres, així com també en l'acumulació de classes de substàncies concretes com: alcans en les ceres; i alcohols, ω -hidroxiàcids i àcid ferúlic en la suberina. Aquest fenotip s'observa tant en les línies NSE com NSC. Tanmateix, amb el silenciament conservat s'observen majors efectes encara, tant a nivell d'acumulació de suberina i ceres com en el nombre de classes de substància afectades. A més, a més, en les línies NSC també s'observa un augment significatiu d'èsters i diàcids. En canvi, pel que fa a les línies de sobreexpressió no s'observa cap efecte remarcable a nivell d'acumulació de suberina i ceres ni a nivell de classes de substàncies. Tot i els efectes a nivell de composició química del periderma de les línies silenciades, la microscòpia electrònica de transmissió (TEM) no mostra canvis en la disposició lamel·lar de la suberina.

En aquesta tesi s'ha obtingut una nova línia transgènica de patatera transformada mitjançant la incorporació del promotor d'*StNAC103* en un vector delator transcriptional que permetrà localitzar a nivell tissular l'activació del promotor a través de les proteïnes GUS o GFP (línia *ProStNAC103::GUS-GFP*). La transformació de patatera s'ha realitzat establint i mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*. Aquesta nova línia ha permès localitzar amb microscòpia òptica de camp clar i de fluorescència, l'activació del promotor d'*StNAC103* a la capa basal del fel-lema, a la base de les lenticel·les i dèbilment a l'endodermis i l'exodermis. També ha servit per detectar activitat del promotor a teixit ferit de tubercle i observar com aquesta activitat es dona concomitantment amb la depleció d'amiloplastos en cèl·lules de la capa de tancament. En concordança amb aquests resultats, l'anàlisi d'acumulació de transcrit mitjançant Real Time PCR, indica que *StNAC103* s'indueix en fel-lema, arrel i teixit ferit. La inducció per ferida s'observa tant en fulla com en tubercle, i els nivells del transcrit van augmentant progressivament al llarg de la cicatrització de ferida. A més, en els dos teixits cicatricials s'observa que el perfil d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* és similar al de dos gens implicats en la biosíntesi de la suberina. Es tracta de la ω -hidroxilasa d'àcids grassos *CYP86A33* i de la feruloil transferasa d' ω -hidroxiàcids i alcohols *FHT*, la qual s'indueix encara abans que *StNAC103* i *CYP86A33*. Cal remarcar que també s'observa inducció d'acumulació de transcrit en fulla sistèmica de plantes ferides.

Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta tesi indiquen que l'activitat del promotor d'*StNAC103* s'indueix en teixits on és activa la síntesi de suberina i l'acumulació del transcrit corresponent es dona concomitantment a la de *CYP86A33* i s'inicia posteriorment a la d'*FHT*. Tanmateix, l'augment en l'acumulació de suberina i ceres en els peridermes silenciats per *StNAC103* suggereix un paper repressor d'aquest factor de transcripció. Tot plegat fa pensar que hi ha d'haver una regulació molt fina de la síntesi de suberina i ceres en el periderma i que *StNAC103* hi té un paper destacat.

Summary

NAC transcription factors are specific of plants. They represent one of the most numerous and widely distributed families among the plantae kingdom. NAC transcription factors have been identified from bryophytes to angiosperms, with a growing diversification that can reach up to 200 genes in a single specie. NAC family members perform very diverse functions such as the establishment of the meristem, morphogenesis and response to virus, stress and senescence. One of these NAC transcription factors was identified in cork oak as a potential candidate to suberin regulation, as transcriptome comparisons and transcript accumulation profiles showed that this gene is up-regulated in suberized tissues. Prior to the present Ph.D. thesis, overexpressing and silencing transgenic potato lines were obtained for the potato ortholog, called *StNAC103*. To silence *StNAC103*, two constructs were obtained: one targeting a specific gene region (transformed lines designated as NSE) and the other against a conserved region of NAC family (NSC transformed lines).

The main objective of this thesis was to acquire knowledge on the role of *StNAC103* in suberized tissues. This was achieved by analyzing the phenotypic effects of *StNAC103* silencing/overexpression in basic aspects of periderm function such as the chemical composition of suberin and waxes, the suberized cell wall ultrastructure and the periderm water permeance. Each type of molecules obtained from suberin and wax extracts were quantified by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). An increase in suberin and wax deposition, as well as specific substance class accumulation was observed in silenced lines: alkanes in waxes; alcohols, ω -hydroxyacids and ferulic acid in suberin. This phenotype was observed both in NSE and NSC lines. Nonetheless the effects of conserved silencing were more significant on suberin and wax accumulation, as well as in respect to the number of substance classes altered. Moreover, a significant increase in esters and diacids can be observed in NSC lines. On the other hand, overexpressing lines did not show any remarkable effect in suberin and wax accumulation, nor in the proportion of each substance class. Despite the effects in chemical composition of periderms in silenced lines, transmission electron microscopy (TEM) did not show any changes on the lamellar organization of suberin.

In this thesis a new transgenic potato line was obtained by means of the insertion of *StNAC103* promoter into a transcriptional reporter vector that allows the tissue localization of promoter activity using two reporter proteins: GUS and GFP (construct: *ProStNAC103::GUS-GFP*). Stable potato transformations were performed by *Agrobacterium tumefaciens*. This new line shows *StNAC103* promoter activation in phellem basal layer and lenticel base, as well as in a weaker way in the endodermis and exodermis. Additionally, it has also been useful for detecting promoter activity in wounded tissue in tuber and to observe how this activation is concomitant to amyloplast depletion in the cells of the closing layer. Transcript accumulation analysis by real time PCR indicates *StNAC103* is induced in phellem, root and wounded tissues. Induction of the gene as a result of wounding can be observed both in leaf and tuber. In addition, the increase in transcript levels in parallel to wound-healing and the *StNAC103* transcript accumulation profile is similar to that of a fatty acid ω -hydroxylase (*CYP86A33*), although the accumulation of ω -hydroxyacid and alcohol feruloyl transferase (*FHT*) transcript starts before. Remarkably, systemic leaves of wounded plants show accumulation of *StNAC103* transcript.

To sum up, the results obtained in this thesis indicate that *StNAC103* promoter activity is induced in tissues undergoing suberin synthesis. Moreover *StNAC103* transcript accumulation is concomitant to that of *CYP86A33* and takes place after that of *FHT*. Nonetheless, an increase of the suberin and wax accumulation in the silenced periderms for *StNAC103* suggests its role as a repressor in suberin and wax accumulation. Altogether these studies support the hypothesis that there exists a very fine regulation of the suberin and wax synthesis in the periderm, in which *StNAC103* plays an important role.

Resumen

Los factores de transcripción NAC son específicos de plantas y una de las familias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Han sido identificados en briófitos y hasta las angiospermas, con una diversificación creciente que llega a 200 genes en una sola especie. La familia NAC de factores de transcripción realiza funciones tan diversas como el establecimiento de meristemas, la respuesta a la senescencia, la morfogénesis o la respuesta al estrés y a los virus. Fue identificado un miembro de la familia NAC en alcornoque como un buen candidato a la regulación de la suberina ya que, en comparaciones de transcriptomas y perfiles de acumulación de transcrito se observó que el gen se inducía de forma preferente en tejidos suberizados. Previamente a esta tesis se obtuvieron en patata líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciadas para el ortólogo de alcornoque en patata: *StNAC103*. El silenciamiento de *StNAC103* fue realizado con dos construcciones: una dirigida a una región específica del gen (líneas transformadas designadas NSE) y la otra contra una región conservada de la familia NAC (líneas transformadas NSC).

El objetivo principal de esta tesis ha sido entender mejor el papel de *StNAC103* en los tejidos suberizados y en consecuencia se ha analizado los efectos fenotípicos del silenciamiento/sobreexpresión de *StNAC103* sobre algunos aspectos básicos para el buen funcionamiento del peridermo, como son la composición química de suberina y ceras, la ultraestructura de la pared celular suberizada y la permeancia del peridermo. El análisis químico se ha realizado mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID) para poder cuantificar cada uno de los tipos de moléculas provenientes de los extractos de suberina y ceras. Se observa que las líneas silenciadas para *StNAC103* presentan un aumento en la deposición de suberina y ceras, así como con una acumulación de clases de sustancias concretas como: alcanos de las ceras; alcoholes, ω -hidroxiácidos y ácido ferúlico de la suberina. Este fenotipo se observa tanto en las líneas NSE como NSC. Por otra parte, en el silenciamiento conservado se observan mayores efectos aún, tanto a nivel de acumulación de suberina y ceras, como en el número de las clases de sustancias afectadas. Además, en las líneas NSC también se observa un aumento significativo de ésteres y diácidos. En cambio, en referencia a las líneas de sobreexpresión no se encuentra ningún efecto remarcable en la acumulación de suberina, ceras o clases de sustancias. Aun teniendo en cuenta los efectos a nivel de composición química del peridermo, ni la microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestra diferencias en la disposición lamelar de la suberina.

En esta tesis se ha obtenido una nueva línea transgénica de patata transformada que incorpora el promotor de *StNAC103* en un vector delator transcripcional que permitirá localizar la activación del promotor a nivel tisular, a través de las proteínas GUS o GFP (línea *ProStNAC103::GUS-GFP*). La transformación estable en patata se ha realizado mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Esta nueva línea ha permitido localizar mediante microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia, la activación del promotor de *StNAC103* en la capa basal del felema, en la base de las lenticelas y débilmente, en la endodermis y la exodermis. También se ha detectado la actividad del promotor en tejido herido de tubérculo y esto se da en concomitancia con la depleción de amiloplastos en células de la capa de cierre. De acuerdo con estos resultados, el análisis de acumulación de transcrito mediante Real Time PCR indica que *StNAC103* se induce en felema, raíz y tejido herido. La inducción por herida se observa tanto en hoja como en tubérculo, y los niveles de transcrito aumentan progresivamente durante la cicatrización de la herida. Además, en los dos tejidos cicatriciales se observa que el perfil de acumulación de transcrito de *StNAC103* es similar al de dos genes implicados en la biosíntesis de suberina. Se trata de la ω -hidroxilasa de ácidos grasos *CYP86A33* mientras que la feruloil transferasa de ω -hidroxiácidos y alcoholes *FHT* se induce con anterioridad aún a *StNAC103* y

CYP86A33. Cabe remarcar que se observa inducción de acumulación de transcrito en hoja sistémica de plantas heridas.

En consecuencia, los resultados obtenidos en esta tesis indican que la actividad del promotor de *StNAC103* se induce en tejidos donde la síntesis de suberina está activa, y la acumulación de transcrito correspondiente se da en concomitancia a la de *CYP86A33* y se inicia posteriormente a la de *FHT*. Por otro lado, el aumento en la acumulación de suberina y ceras en el peridermo silenciado para *StNAC103* sugiere un papel represor de este factor de transcripción. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren una regulación muy fina de la síntesis de suberina y ceras en el peridermo y que *StNAC103* tiene en ésta, un papel destacado.

Introducció general

Factors de transcripció

La regulació de l'expressió gènica és un punt central en la modulació dels processos de desenvolupament i en el control de la resposta a estressos biòtics i abiòtics. La regulació a nivell transcripcional té un paper important en la regulació de l'expressió gènica. En aquest aspecte, els factors de transcripció són proteïnes que activen o reprimeixen la transcripció del DNA de manera que s'afavoreix o impedeix que l'RNA polimerasa i els factors generals de la transcripció s'uneixin a la caixa TATA. Actuen per mitjà de la seva unió amb elements reguladors en *cis* (funció molecular GO:0003677) que estan a 5' de la caixa TATA, i que corresponen a seqüències curtes dins el promotor del gen. Els factors de transcripció generalment formen part de complexos proteics activadors o repressors que promouen o bloquegen el reclutament de l'RNA polimerasa (Riechmann *et al* 2000). A més, els factors de transcripció poden activar o reprimir la transcripció per mitjà de la interacció amb altres proteïnes. Depenent de la interacció proteïna-proteïna un factor de transcripció pot funcionar com a activador d'un conjunt de gens i repressor d'un altre conjunt. Així els factors de transcripció (TFs) actuen com a reguladors del destí cel·lular, cicle cel·lular, estructura, proliferació, desenvolupament, diferenciació i adaptació a l'entorn. Proteïnes addicionals com els coactivadors, remodeladors de cromatina, acetilases d'histona, desacetilases, cinases, i metilases, també tenen un paper crucial en la regulació gènica, però sense que s'hi vegin implicats dominis d'unió al DNA. És per això que no es classifiquen com a factors de transcripció. La complexitat creixent que suposaven els factors de transcripció és un element clau que va permetre l'evolució dels éssers vius i el pas dels organismes unicel·lulars als pluricel·lulars. Les plantes i els animals mostren un repertori molt complex de factors de transcripció (més gens i amb més dominis proteics que les algues pluricel·lulars o els fongs). L'èxit evolutiu i la gran diversitat d'animals i plantes es pot explicar en bona part per l'adquisició d'una gran complexitat en el control transcripcional (Charoensawan *et al* 2010). En els animals els factors de transcripció s'expressen sobretot en el desenvolupament embrionari i, en menor quantitat quan són adults, mentre que a les plantes es mantenen actius al llarg de tot el desenvolupament post embrionari, i regulen la formació de noves estructures (branques, fulles, flors, etc.) i la resposta a l'estrès (de Mendoza *et al* 2013). A les plantes s'ha identificat prop de 130.000 TFs que s'agrupen en 58 famílies (Jin *et al* 2013). La major part d'aquestes famílies són comunes amb els animals, però algunes són específiques de les plantes. Factors de transcripció específics de plantes són per exemple: AP2/ERF, Dof, B3, SBP, WRKY i NAC. En les plantes la regulació de la transcripció (procés biològic GO:0045449) està involucrada en gairebé tots els aspectes de l'activitat cel·lular (Xiong *et al* 2005). La seqüenciació de genomes sencers de plantes ha evidenciat que aquests factors formen grans famílies, amb més de 100 components en alguns casos (Kikuchi *et al* 2000).

La família NAC

Les proteïnes NAC són una família de factors de transcripció específica de plantes àmpliament distribuïda que presenta un domini N-terminal, –domini NAC- altament conservat. Els gens *NAC* s'anomenen així per les primeres lletres dels gens *NAM* (*No Apical Meristem*), *ATAF* (*Arabidopsis Transcription Activation Factor*) i *CUC* (*CUp-shaped Cotyledon*), en els quals es va identificar la seqüència consens del domini conservat (Aida *et al* 1997). El primer gen descrit d'aquesta família va ser el *NAM* de petúnia, els mutants defectius del qual no desenvolupen correctament el meristema apical, cosa que provoca la inviabilitat des de l'estadi de plàntula (Souer *et al* 1996). Seguidament es va publicar un treball sobre els gens *CUC1* i *CUC2*, el doble mutant dels quals donava lloc a cotiledons en forma de copa degut a la fusió dels teixits que formen els dos cotiledons i a la fusió de pètals i estams i a la pèrdua del meristema apical de la tija (Aida *et al* 1997). El primer treball publicat sobre els gens *ATAF 1* i *2* es va donar degut a la identificació d'un gen de patata (*Solanum tuberosum*) que s'indueix per ferida, *StNAC*, amb gran similitud a *ATAF1* i *2*, les seqüències dels quals estaven dipositades al Genbank des de 1993 (Collinge i Boller 2001).

Les proteïnes NAC són al centre de la regulació de diversos processos de desenvolupament i morfogènia, per exemple la formació del meristema apical de la tija, òrgans florals i tiges laterals (Olsen *et al* 2004, Souer *et al* 1996) i el desenvolupament embrionari (Aida *et al* 1997). També actuen en la resistència a malalties (Collinge i Boller 2001, Hegedus *et al* 2003) i estressos com el salí, la sequera, el xoc per fred o la ferida mecànica (Xia *et al* 2010). S'ha demostrat que les proteïnes NAC tenen un rol en la regulació de la xilogènesi i el desenvolupament de les fibres (Yamaguchi *et al* 2011), la senescència (Balazadeh *et al* 2011) i la resposta a infeccions (Xie *et al* 1999).

Origen filogenètic i distribució

La família NAC és una de les més àmplies en el genoma de les plantes, representada per 109 gens a *Arabidopsis* (Jensen *et al* 2009), 140 a l'arròs (Xiong *et al* 2005, Fang *et al* 2008), 101 a la soja (Pinheiro *et al* 2009) i 110 a la patatera (Singh *et al* 2013), entre altres. Els estudis filogenètics a *Arabidopsis*, *Populus trichocarpa* i *Oryza sativa* mostren una gran expansió i diversificació dels gens *NAC* en dicotiledònies i monocotiledònies. Com a resultat, la família presenta un alt grau de divergència funcional (Nuruzzaman *et al* 2010). Els gens *NAC* es troben presents a totes les plantes, des dels briòfits fins a les angiospermes, i representen un dels grups més grans de factors de transcripció del regne vegetal. La seva aparició sembla anterior als 400 milions d'anys. No s'han descrit a cloròfits, glaucòfits, ni algues vermelles, si bé la informació disponible encara és escassa. Des d'una perspectiva evolutiva també és interessant notar la similitud de la zona central del domini NAC amb les proteïnes d'unió al DNA GCM (*Glial Cells Missing*) dels metazous (Cohen *et al* 2003).

Les proteïnes NAC tenen un domini N-terminal conservat i un domini C-terminal altament variable, que està involucrat en la regulació de la transcripció (Olsen *et al* 2005a). El domini NAC compren uns 160 residus dividits en 5 subdominis (Aida *et al* 1997). A més, el domini NAC conté senyals de localització nuclear, un domini d'unió al DNA i un de formació d'homodímers i hetero amb altres proteïnes NAC (Duval *et al* 2002). El domini C-terminal actua com a activador o repressor transcripcional i en conseqüència, es creu que té activitat d'unió a proteïnes (Jensen *et al* 2009, Hu *et al* 2010).

Des de la descoberta del primer factor de transcripció NAC l'any 1996, la identificació i descripció de membres d'aquesta família ha despertat més i més interès, com ho demostren la quantitat d'estudis publicats. La seqüenciació de genomes sencers -sobretot de plantes d'interès agronòmic- ha proporcionat l'oportunitat de realitzar l'anàlisi filogenètic dels gens *NAC* en aquestes espècies. És el cas d'*Arabidopsis* (Jensen *et al* 2009), arròs (Ooka *et al* 2003), vinya (Wang *et al* 2013), pollancre (Hu *et al* 2010), patatera (Singh *et al* 2013), bananer (Cenci *et al* 2014) i pebrotera (Kim *et al* 2014). Aquest tipus d'estudis ha permès establir les relacions filogenètiques i la classificació de subgrups o subfamílies (Zhu *et al* 2012).

La gran diversitat de la família NAC -entre 100 i 200 gens en cada espècie- en angiospermes contrasta respecte als 30 gens *NAC* en les moltes (Zhu *et al* 2012). L'expansió d'aquesta família de factors de transcripció a les plantes vasculares s'ha produït per duplicació gènica de segments (Nuruzzaman *et al* 2010), en tàndem (Zhu *et al* 2012) o bé per duplicacions completes del genoma, com està descrit per *Arabidopsis* (Simillion *et al* 2002, Jensen *et al* 2009), pollancre (Tuskan *et al* 2006, Hu *et al* 2010), arròs (Nuruzzaman *et al* 2010), mill italià (Puranik *et al* 2013), vinya (Wang *et al* 2013) i patatera (Singh *et al* 2013).

Els diversos estudis filogenètics referents als gens *NAC* agrupen els membres d'aquesta família en subgrups o subfamílies en funció del seu grau d'homologia (Figura 1). Per exemple, en *Arabidopsis* i d'acord amb el treball de Jensen *et al* (2009) se'ls distribueix en deu subfamílies. Depenent de l'estudi, el coneixement del genoma de l'organisme i depenent de l'espècie, varia el nombre de subfamílies. Altres organismes amb el genoma seqüenciat, com el bananer en presenten 8 (Cenci *et al* 2014) i a la patatera s'ha designat 12 subfamílies (Singh *et al* 2013).

Com que les subfamílies es basen en l'homologia de les seqüències, agrupen gens dedicats majoritàriament a un tipus de funció, malgrat que dins una mateixa subfamília també hi pot haver diferents graus de diversificació funcional (Fang *et al* 2008, Pinheiro *et al* 2009, Hu *et al* 2010). Per exemple, en un treball de Shen *et al* (2009) realitzat sobre 11 espècies, les funcions dels gens *NAC* de resposta a estrès, resposta a citoquinines, regulació de la paret cel·lular i organogènesi s'agrupen en les famílies NAC-a, NAC-b, NAC-c i NAC-d, respectivament.

La relació entre la funció d'un gen *NAC* i la seva seqüència va més enllà de l'agrupació filogenètica, ja que té relació amb la presència de motius conservats dins el domini variable o C-terminal de la proteïna. Així, s'ha

trobat motius conservats en el domini C-terminal per als NAC involucrats en la formació de la lignina (Shen *et al* 2009).

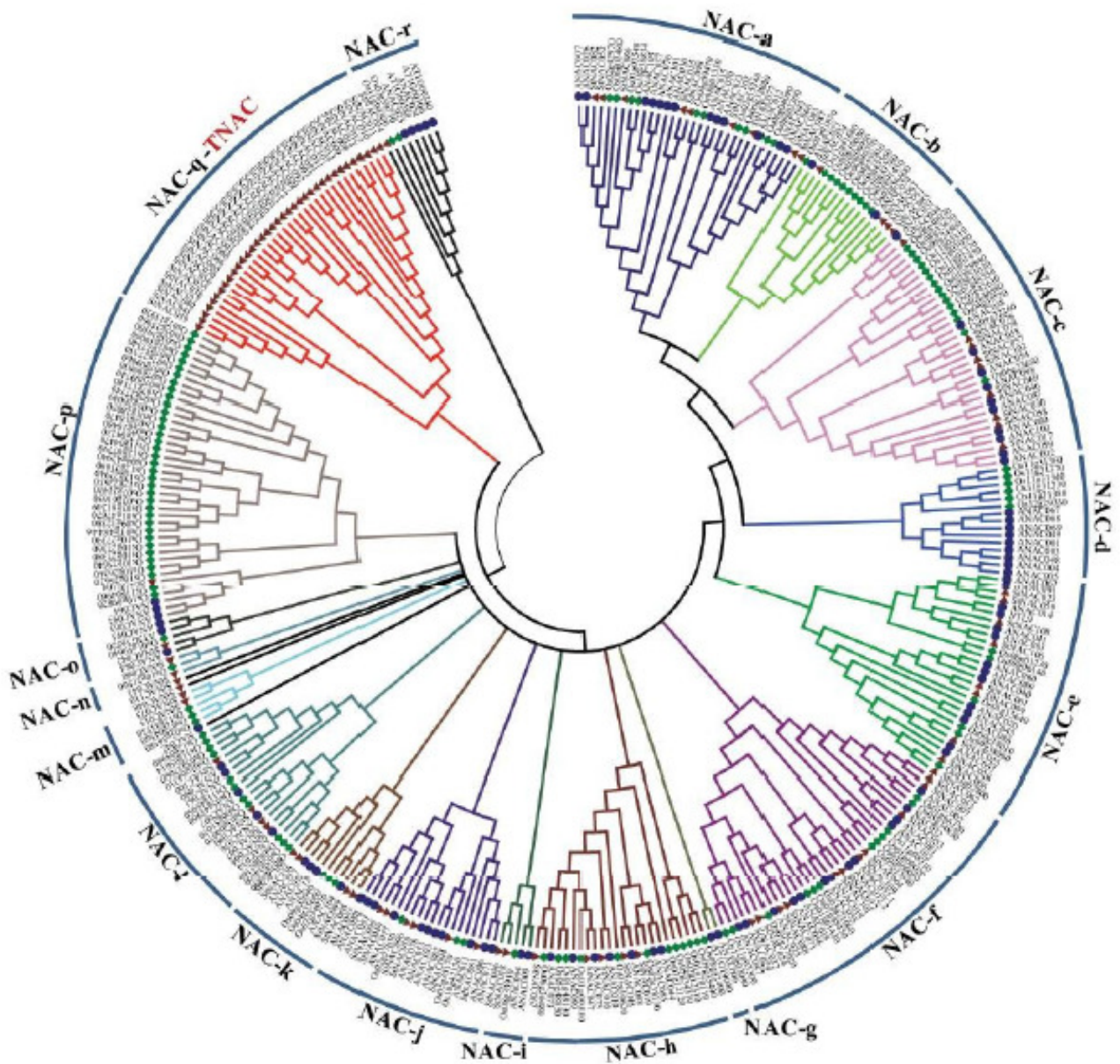


Figura 1 Filograma de proteïnes NAC de patatera, Arabidopsis i arròs extret del treball de Singh *et al* (2013). Es mostra com s'agrupen segons la similitud filogenètica, les seqüències dels NAC que hi figuren. Les de patatera es mostren amb un triangle, les d'Arabidopsis amb un cercle i les d'arròs amb un rombe.

Diversitat funcional de les proteïnes NAC

L'expansió d'aquesta família a través de duplicacions gèniques i duplicacions del genoma ha permès, per una banda, la redundància funcional, el solapament de funcions i l'especialització de funcions i amb el temps, l'aparició de noves funcions (Raman *et al* 2008). La redundància funcional dóna més robustesa als mecanismes de regulació davant la mutació. Com a resultat de la mutació, canvis en la pauta de lectura i la longitud dels exons, han aparegut noves funcions i especialitzacions de les funcions existents. En són exemples el cas de la subfamília NAC-j, específica de pollancre (Hu *et al* 2010), o el grup NAC-f que no és present en molses, i la subfamília TNAC, exclusiva de solanàcies (Rushton *et al* 2008). Per al correcte desenvolupament de l'organisme hi ha subfamílies més necessàries que altres. És així en el cas dels gens NAC dedicats a la iniciació d'òrgans i activació de meristemes i també les subfamílies que agrupen gens amb funció de regulació de vasos del xil·lema. Altres subfamílies contenen gens amb funcions adaptatives al medi, com la resposta a diversos estressos i encara algunes de poc caracteritzades que no són tan crucials per a la viabilitat de la planta.

Per tal de dur a terme les seves funcions les proteïnes NAC formen homodímers o hetero (Olsen *et al* 2004, Hegedus *et al* 2003, Jeong *et al* 2009). Alternativament, poden interaccionar amb algunes proteïnes no NAC (Xie *et al* 2002), com per exemple, factors de transcripció o proteïnes de la via de transducció del senyal d'ABA (Kim *et al* 2009, Rauf *et al* 2013) i també proteïnes d'altres organismes, com són els virus (Xie *et al* 1999, Ren *et al* 2000, Selth *et al* 2005).

Les proteïnes NAC en la iniciació o formació d'òrgans.- Els estudis amb gens *NAM* i *CUC* han proveït evidències del rol de les proteïnes NAC en el desenvolupament embrionari, vegetatiu i floral. Una de les funcions més ben caracteritzades és el rol en la delimitació d'òrgans primerencs durant el desenvolupament i morfogènesi (Weir *et al* 2004, Kim *et al* 2008). Més concretament, s'ha trobat membres de la família NAC involucrats en la formació de meristemes (Aida *et al* 1997, Souer *et al* 1996, Takada *et al* 2001, Vroemen *et al* 2003), el desenvolupament floral (Sablowski i Meyerowitz 1998, Ishida *et al* 2000) i el d'arrels laterals (Xie *et al* 2000). En aquest darrer cas, s'ha demostrat un rol per a NAC1 i altres NAC induïts per auxines. En referència als òrgans florals i vegetatius, els gens *CUC1* i *CUC2* d'*Arabidopsis*, *CUC3* i *CUP* d'*Antirrhinum majus* i *NAM* de *Petunia hybrida* s'expressen als límits dels teixits i són necessaris per al correcte desenvolupament d'aquests òrgans (Aida *et al* 2002). Un altre factor de transcripció necessari per al desenvolupament floral és NAP (*NAC-like activated by Apetala 3/Pistillata*), que actua en l'establiment i separació dels òrgans florals (Sablowski i Meyerowitz 1998). Pel que fa a la formació de meristemes axil·lars, la funció redundat dels gens *CUC* és necessària per a la iniciació dels meristemes axil·lars (Raman *et al* 2008).

Les proteïnes NAC en el sistema de regulació de la formació de vasos del xilema.- En relació a la formació de vasos, s'ha trobat diversos gens de la família NAC involucrats en processos d'aquest tipus. Així, els gens

VND de l'1 al 7 (*Vascular-Related NAC Domain 1-7*) tenen un paper crucial en la diferenciació dels vasos del xilema, induint l'expressió de diversos gens que regulen o intervenen en la diferenciació. Per exemple, la sobreexpressió de VND7 indueix l'expressió de diversos *CesA* (*Celulosa Sintasa*), *IRX* (*Irregular Xylem*) i *MYB* (Yamaguchi *et al* 2011), i els VND de l'1 al 6 exerceixen funcions redundants o de cooperació amb VND7 (Yamaguchi *et al* 2008, Yamaguchi *et al* 2010). També relacionats amb la paret cel·lular, s'han descrit l'NST1 (*NAC Secondary Wall Thickening Promoting Factor 1*) i l'NST3, filogenèticament propers als VND. Els NST1 i 3 són reguladors de l'engruiximent secundari de les parets cel·lulars, i el seu silenciament dóna lloc a defectes evidents en l'engruiximent de la paret secundària del xilema i concretament en l'acumulació de lignina i cel·lulosa (Kubo *et al* 2005, Zhong *et al* 2007, Ko *et al* 2007, Mitsuda *et al* 2007). En relació al procés de modificació de la paret cel·lular secundària, ha despertat especial interès i s'ha descrit el paper clau d'alguns NAC en *P. trichocarpa* per tractar-se d'una planta amb desenvolupament secundari. Els NAC *PtrWND*, ortòlegs d'*SND1* d'*Arabidopsis*, s'expressen en teixits lignificats del xilema (vasos, fibres llenyoses en desenvolupament del xilema i el parènquima radial), i la seva expressió activa l'expressió de gens de la biosíntesi de lignina, a més de promoure la deposició de la paret secundària (Zhong *et al* 2009).

Les proteïnes NAC en resposta als estressos abiòtic i biòtic.- Es coneix que els factors de transcripció NAC interactuen en un rang molt divers de processos de regulació de l'estrès abiòtic i biòtic (Olsen *et al* 2005b). S'ha descrit membres de la família NAC, sobretot en la subfamília ATAF, associats a diverses funcions de resistència o resposta, alguns d'aquests NAC desenvolupen un paper en més d'una d'aquestes funcions. Són estressos on intervenen factors de transcripció NAC, la sequera (Hegedus *et al* 2003, Fujita *et al* 2004, Tran *et al* 2004, Hu *et al* 2006), la salinitat (Tran *et al* 2004, Hu *et al* 2006), el fred (Hegedus *et al* 2003), les ferides (Collinge i Boller 2001) o la hipòxia (Christianson *et al* 2009b), entre altres.

Un exemple concret és el cas d'ANAC019, ANAC055 i ANAC072 (RD26), que s'indueixen per sequera, salinitat i ABA (Tran *et al* 2004). ANAC019 i ANAC055 funcionen com a activadors de la transcripció per regular l'expressió de gens de defensa induïts per JA (Bu *et al* 2008). ATAF1 i ATAF2 són mediadors de la senyalització mitjançada per ABA en processos de resposta a la ferida i diversos estressos abiòtics, a més de la infecció per patògens necrotròfics, i la seva sobreexpressió indueix una resposta hipersensible a aquests estressos (Wu *et al* 2009).

En relació a la defensa contra patògens, s'ha observat que alguns NAC intervenen en la resposta de la planta en la immunitat innata (Donze *et al* 2013), davant herbívors (Hegedus *et al* 2003), fongs (Collinge i Boller 2001) i bacteris (Wang *et al* 2009). Cal destacar que *StNAC* de patatera s'indueix a causa de la infecció per fongs (Collinge i Boller 2001).

Les proteïnes NAC en les infeccions per virus.- En el cas d'infeccions per virus, tant es donen intervencions de gens NAC per neutralitzar-los, com situacions on el virus segresta i utilitza el factor de transcripció NAC per a la seva replicació. Aquest darrer és el cas d'*SINAC1* (Selth *et al* 2005) i *RIM1* (Yoshii *et al* 2009). En

sentit contrari, els factors NAC GRAB (*Geminivirus Rep A-binding*) i TIP (*Turnip crinckle virus interacting protein*) s'ha descrit que estan involucrats en la resistència a virus (Xie *et al* 1999, Ren *et al* 2000). En el cas de TIP però, hi ha controvèrsia si és realment NAC qui impedeix l'acció del virus o la proteïna de la càpside CP (*Coat Protein*) que interactua amb TIP i és el complexe CP-TIP qui fa aquesta funció (Jeong *et al* 2008).

Els geminivirus són virus de plantes, petits, de cadena de DNA circular i monocatenària, que usen la maquinària cel·lular per amplificar els seus genomes. Les proteïnes Rep i RepA (*Geminivirus replication enhancer*) són essencials per a la seva replicació. Així es va trobar que la proteïna RepA interactuava amb factors de transcripció NAC GRAB1 i GRAB2, fet que dona com a resultat la inhibició de la replicació del virus. Les proteïnes GRAB es van identificar per primer cop en blat, en interacció amb la proteïna RepA del TCV (*Turnip Crinkle Virus*) (Xie *et al* 1999). En arròs *OsNAC10* s'expressa com a conseqüència de la infecció per diversos virus (RDV - *Rice dwarf phytoeovirus*; RBSDV - *Rice black-streaked dwarf fiji virus*; RGSV - *Rice grassy stunt tenuivirus*; i RRSV - *Riceragged stunt oryzavirus*). A més a més, en plàntules d'arròs infectades per RSV (*Rice stripe virus*) i RTSV (*Rice tungro spherical virus*) s'indueixen 19 i 13 factors de transcripció NAC respectivament, dels quals s'ha suggerit que sis confereixen resistència al virus degut que s'indueixen tant per RSV, com per RSTV (Nuruzzaman *et al* 2010).

Les proteïnes NAC en relació a la mort cel·lular i la senescència.- Els factors de transcripció NAC juguen rols importants en la regulació de la senescència en fulles d'*Arabidopsis* (Kim *et al* 2009, Kusaba *et al* 2013). Més de 30 membres de la família presenten l'expressió alterada en els diferents moments del procés de senescència (Breeze *et al* 2011). En un elegant estudi on s'analitza la senescència derivada de l'estrès salí en relació a ANAC092, es troba que 78 dels 170 gens que indueix ANAC092 corresponen a gens coneguts, relacionats amb la senescència (Balazadeh *et al* 2011). A més, també es va trobar que ANAC092 funcionava com a regulador superior d'un conjunt d'altres factors de transcripció NAC (ANAC010, ANAC041, ANAC054, ANAC083, ANAC084). També en referència a la senescència, ANAC019 i ANAC055 s'expressen en moments diferents del procés de mort cel·lular, malgrat la seva gran similitud a nivell de promotor. A més, sembla ser que juguen rols oposats en la regulació de l'àcid jasmònic i l'àcid salicílic, considerades vies antagòniques en la resposta a patògens (Hickman *et al* 2013). Segons els autors, ANAC019 està relacionat amb l'activació de la síntesi de flavonoides i antocians i la regulació negativa d'ANAC055 implica la regulació negativa de gens relatius als cloroplasts, la qual cosa desencadena un procés de senescència més accelerat. VND6 i VND7, relacionats amb la formació del xilema, també desencadenen l'expressió d'un gen relacionat amb la mort cel·lular programada, com és el cas de XCP1 (*Xylem Cystein Proteinase*, Yamaguchi *et al* 2010).

Les proteïnes NAC en la regulació a llarga distància.- Els gens NAC han arribat a assolir un nivell sorprenent d'especificitat i complexitat en les seves funcions. Aquest és el cas d'un factor NAC (CmNACP) de carbassa relacionat amb la regulació a llarga distància. L'mRNA de CmNACP és transportat a través del floema on és estabilitzat mitjançant proteïnes, i circula des del cos de la planta fins al meristema, on s'acumula de manera selectiva i presumiblement hi actua (Ruiz-Medrano *et al* 1999).

Regulació dels factors de transcripció NAC

Pel què fa a la regulació de l'expressió gènica, s'ha descrit que els gens NAC són sensibles a diferents hormones com l'ABA (Fujita *et al* 2004), el metil jasmonat (Fujita *et al* 2004) o l'etilè (Pei *et al* 2013). En un cas s'ha descrit que aquesta regulació per hormones ve donada per l'activació d'un altre factor de transcripció (bZIP) que actuaria sobre un gen *ATAF* (Christianson *et al* 2009a).

Per altra banda s'ha observat que l'activitat dels factors de transcripció NAC es pot regular a diferents nivells: post-transcripcional, post-traducciona i d'activitat de la proteïna. A nivell post-transcripcional la regulació de gens *NAC* es dona a través de miRNA. S'ha descrit que els gens *AtCUC1* i *AtCUC2* estan regulats pel miRNA164 (Laufs *et al* 2004, Mallory *et al* 2004) i s'ha trobat dianes conservades per a miRNA als gens *AmCUP* i *PhNAM*, però no a *AtCUC3* (Mallory *et al* 2004). Recentment s'ha publicat un estudi sobre el miRNAoma de patatera (Lakhotia *et al* 2014) que obre la porta a la identificació sistemàtica de les dianes dels miRNA en els diversos transcrits, entre ells els dels gens *NAC*. A nivell post-traducciona, s'ha descrit un sistema de proteòlisi mitjançada per ubiquïtines que regula l'acumulació d'una proteïna *NAC* (*SINAT5*, una proteïna *RING-finger* que té activitat lligasa d'ubiquïtina, pot ubiquïtinar *NAC1*) (Xie *et al* 2002). A nivell de regulació de l'activitat proteica dels factors de transcripció *NAC*, s'ha descrit la interacció amb una cinasa i una fosfatasa. En concret, *ATAF1* i la cinasa *SnRK1* (*SNF1-related protein kinase*) es va trobar que interaccionaven en un assaig de doble híbrid (Kleinow *et al* 2009), i *ANAC019* és defosforil·lat *in vivo* per la fosfatasa *RCF2/CPL1*, la interacció de les quals es va evidenciar per un assaig de complementació bimolecular de fluorescència (BiFC) (Guan *et al* 2014).

Per altra banda, s'ha observat alguns gens *NAC* amb una complexa xarxa de regulació, i que poden regular membres de la mateixa família, com s'ha vist en el cas de *CUC3*, la transcripció del qual és promoguda per *CUC1* i *CUC2* (Vroemen *et al* 2003). Fins i tot es pot donar el cas que promoguin la seva pròpia transcripció, com és el cas *NAC1* (Xie *et al* 2000).

La família NAC a les Solanàcies

En solanàcies s'ha estudiat la filogènia de la família *NAC* de factors de transcripció només en patatera (Singh *et al* 2013) i tabac (Rushton *et al* 2008). Tanmateix, a nivell de gens individuals, hi ha diversos estudis de caracterització de factors de transcripció *NAC* en solanàcies. En són exemples el primer gen *NAC* caracteritzat, el *NAM* de petúnia (Souer *et al* 1996) i, posteriorment, *SINAC1* de tomatera, que està implicat en la replicació del virus de la fulla arrissada (TLCV) (Selth *et al* 2005) i que respon a diversos estressos com

el fred, la calor, la salinitat, l'osmòtic i la ferida mecànica, així com les hormones àcid abscísic, metiljasmonat, àcid salicílic, gibberel·lines, i etilè, i també el peròxid d'hidrògen i metil viològen (Ma *et al* 2013). *SNAC4* afavoreix la maduració dels fruits i l'acumulació de carotenoides (Zhu *et al* 2014a), i *CaNAC1* de pebrot, actua en la resposta hipersensible a patògens bacterians (Oh *et al* 2005). Pel gen de tomaquera SENU5 (l'ortòleg d'*StNAC106*) s'ha trobat que la seva expressió és màxima durant la senescència de les fulles (John *et al* 1997).

Una peculiaritat de la família de factors de transcripció NAC és la subfamília TNAC. Aquesta és específica de solanàcies i no es troba en altres plantes. Els TNAC estan subdividits en tres clades A, B i C. Les seves funcions han estat poc descrites i es creu que els del clade A poden jugar algun paper en la resposta a l'estrès en *N. tabacum*, com és el cas d'*NtNAC84*, aïllat de plantes tractades amb fred. Alguns membres del grup TNAC, dels clades B i C, s'expressen en tot l'organisme, mentre que els de l'A tenen una expressió sobretot en arrels i fulles joves (Rushton *et al* 2008).

En patatera s'ha identificat 110 gens *NAC* distribuïts en 12 subfamílies i que donen lloc a 136 proteïnes diferents (Singh *et al* 2013). Fins al moment només se n'ha caracteritzat quatre: *NAC* (*StNAC069*), *CUC3* (*StNAC044*), *StNAM* i *StNAC033*. Els gens *StNAC069* i *StNAC044* actuen en el procés de definició dels límits foliars (Blein *et al* 2008); *StNAM* s'expressa en els estadis primerencs del desenvolupament foliar (Blein *et al* 2008); *StNAC033*, té una funció similar als gens ATAF i ha estat relacionat amb la ferida. En concret, s'indueix fortament i local després de la ferida i per infecció amb *Phytophthora* (Collinge i Boller 2001).

El periderma i el fel·lema

El periderma és l'estructura dèrmica que substitueix l'epidermis en els òrgans madurs (secundaris) de la planta com les tiges i arrels llenyoses i els tubercles. El periderma també protegeix els teixits cicatricials. El desenvolupament del periderma és essencial per a la supervivència de les plantes a l'atmosfera. En les plantes llenyoses forma part de l'escorça externa que protegeix el tronc, mentre que en les dicotiledònies herbàcies sovint queda limitada a l'arrel i la base de la tija.

El periderma conté tres capes: el fel·lema o súber a la part externa; el fel·logen, que és la capa mare; i la fel·loderma a la part interna (Figura 2). El fel·lema o súber és pròpiament el teixit limitant o barrera, impermeable a l'aigua i els gasos, que protegeix els teixits interns. Consisteix en vàries capes de cèl·lules

mortes densament empaquetades amb les parets impregnades de suberina i ceras (Evert i Eichhorn 2006). La fel·loderma, en canvi, està formada per una o poques capes de cèl·lules parenquimàtiques que difícilment es distingeixen del parènquima cortical.

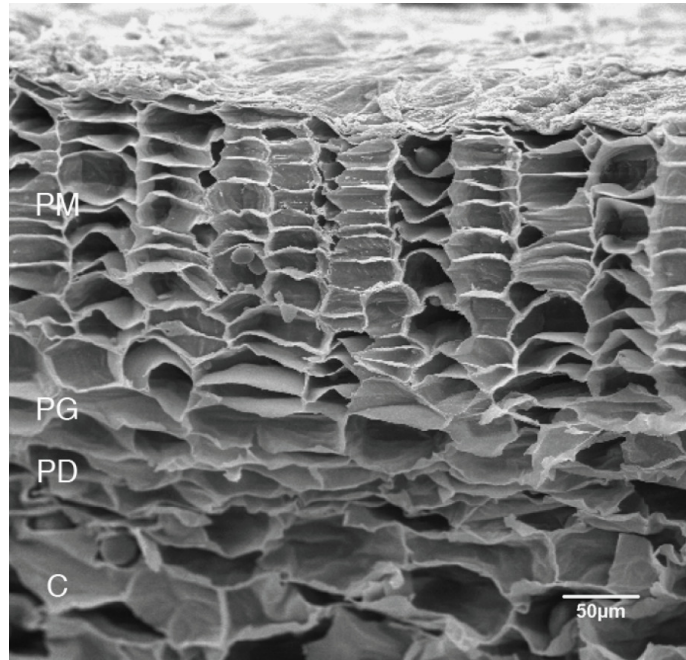


Figura 2 Estructura del periderma de tubercle de patata. Imatge de microscopia electrònica extreta de Serra (2008). Es mostren el fel·lema (PM), el fel·logen (PG), la fel·loderma (PD) i el parènquima (C).

La gran importància del periderma rau en la seva funció de protecció, que té lloc de forma més notable, en l'escorça de les plantes llenyoses. En aquestes, el desenvolupament del periderma fa que se separi una certa quantitat de teixits de la planta, que queden aïllats i moren. El conjunt de teixits separats equival a l'escorça externa o ritidoma. Així doncs, les qualitats de l'escorça o ritidoma vindran determinades pel gruix i disposició dels estrats separats pel periderma, per la mida de les cèl·lules que els formen, la seva disposició, i la composició del replè final del lumen -habitualment aire i menys freqüentment sòlid o resinós-. D'aquests paràmetres, en resultaran unes qualitats o unes altres pel què fa al conjunt del ritidoma o escorça (Iqbal 1995; Evert i Eichhorn 2006)i, per tant, una varietat d'escorces en les diferents espècies que al llarg de la història ha estat aprofitada per a obtenir productes químics d'interès –tints i principis actius- o per a fer-ne ús divers i materials de construcció. El cas més paradigmàtic de ritidoma impermeable és

precisament el que presenta un periderma més desenvolupat, el de l'alzina surera (*Quercus suber*), el qual s'aprofita sobretot per fer taps i materials aïllants per a la construcció. Aquest aprofitament important i perllongat en la història ha generat un gran interès per l'estudi del periderma. Tanmateix, el model més utilitzat per a l'estudi del periderma i el fel·lema és la pell del tubercle de patata. Pel seu interès agronòmic, el periderma de la patata també ha estat molt ben estudiat (Lulai 2007). Els tubercles contenen abundant teixit parenquimàtic molt ric en midó, que es conserva per períodes molt llargs protegit pel periderma. El fel·lema pròpiament constitueix la pell de color marró. Quan el fel·lema experimenta un creixement com a conseqüència de l'activitat del fel·logen, la capa del fel·lema es pot separar fàcilment dels teixits vius per arrossegament mecànic. Un cop el creixement s'atura, es produeix un procés de maduració durant el qual el fel·logen entra en un període de repòs: deixa de dividir-se i les parets s'engruixeixen, amb la qual cosa s'adhereix fortament al fel·lema. Aquest fel·lema es pot aïllar fàcilment perquè el teixit suberitzat és resistent a la degradació enzimàtica de pectinasa i cel·lulasa. El material aïllat s'anomena periderma en concordança amb la bibliografia (Serra *et al* 2009a, Schreiber *et al* 2005), malgrat que representa sols el fel·lema. Això fa del tubercle de patata un model apropiat per a estudiar processos relacionats amb el periderma, el fel·lema i el procés de suberització. D'altra banda, l'eficiència de transformació de patata amb *A. tumefaciens* és bona, la qual cosa permet aplicar la genètica inversa per a estudis relacionats amb el periderma i el procés de suberització.

La suberina i les ceres

La funció aïllant del fel·lema s'atribueix al caràcter altament hidrofòbic de la suberina i les ceres que impregnen les parets cel·lulars.

Característiques químiques i composició

La **suberina** és un polímer tridimensional molt complex format per dos dominis units covalentment: un domini aromàtic i un domini alifàtic (Figura 3). El domini aromàtic és semblant a la lignina però amb predomini d'unitats derivades de l'àcid ferúlic i quantitats molt menors de monolignols (*p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol), i es diposita a la paret primària (Bernards i Razem 2001). El domini alifàtic,

anomenat també suberina alifàtica, suberina o polièster està conformat per glicerol esterificat amb àcids grassos hidroxilats de cadena llarga i molt llarga (C_{16} – C_{28}) i amb petites quantitats d'àcid ferúlic (Moire *et al* 1999). La suberina és molt semblant a la cutina –que impregna la paret de les cèl·lules de l'epidermis-, però se'n distingeix pels monòmers, que són de cadena més llarga, i per presentar una proporció de diàcids molt més elevada. La suberina alifàtica es diposita internament a la paret, i forma una matriu lipòfila en la qual s'hi troben embeguts un conjunt de lípids solubles o ceres (vegeu revisions entre altres de Kolattukudy (1980), Nawrath (2002), Franke and Schreiber (2007), Pollard *et al* (2008)).

Per a l'anàlisi química de la suberina és necessària l'extracció prèvia de les ceres solubles amb solvents orgànics, per tal que no interfereixin i poder-les analitzar a part, i posteriorment una despolimerització de la suberina. Com que es tracta d'un polímer insoluble, requereix d'un procediment d'hidròlisi per tal d'obtenir separats els monòmers que la componen. Aquest procediment habitualment es duu a terme mitjançant el trencament d'enllaços ester, o procés de transesterificació (Kolattukudy i Agrawal 1974, Franke *et al* 2005, Graça i Santos 2007). La despolimerització allibera una barreja de compostos lipídics de cadena llarga (C_{16} – C_{18}) (LCFA) i molt llarga (C_{18} – C_{32}) (VLCFA), juntament amb glicerol i petites quantitats d'àcids hidroxinàmics, principalment ferúlic (Graça i Santos 2007). Els lípids majoritàriament consten d' α,ω -diàcids i ω -hidroxiàcids però també s'alliberen àcids i alcohols primaris. La composició de la suberina varia entre les espècies i teixits (Franke *et al* 2005, Graça i Santos 2007, Beisson *et al* 2012, Pollard *et al* 2008). Alhora, els diferents mètodes d'extracció presenten rendiments diferents. Així a la taula 1 s'hi mostra la composició de la suberina de tubercle de patata, de diferents varietats i amb diferents mètodes d'extracció. És interessant veure com, depenent del mètode emprat varia substancialment la quantitat d'alcanols i àcids alcanòics que s'extreuen. Amb tot, el conjunt dels estudis evidencien que els monòmers més abundants de la suberina són els àcids α,ω -dicarboxílics, seguits dels ω -hidroxiàcids. A la taula 2, extreta de l'estudi de (Holloway 1983) s'hi mostren les composicions -en percentatge de cada monòmer- de les suberines de diferents espècies. En aquesta taula crida l'atenció que la composició química de la suberina no està tan relacionada amb l'organització taxonòmica sinó, com és lògic, amb variacions qualitatives de l'escorça. Per exemple, es pot apreciar que *Quercus robur* i *Quercus ilex* contenen la meitat d'àcids α,ω -dicarboxílics que *Q. suber*, mentre que aquest té una quantitat d'àcids α,ω -dicarboxílics similar a *Acer griseum* i *Acer pseudoplatanus*.

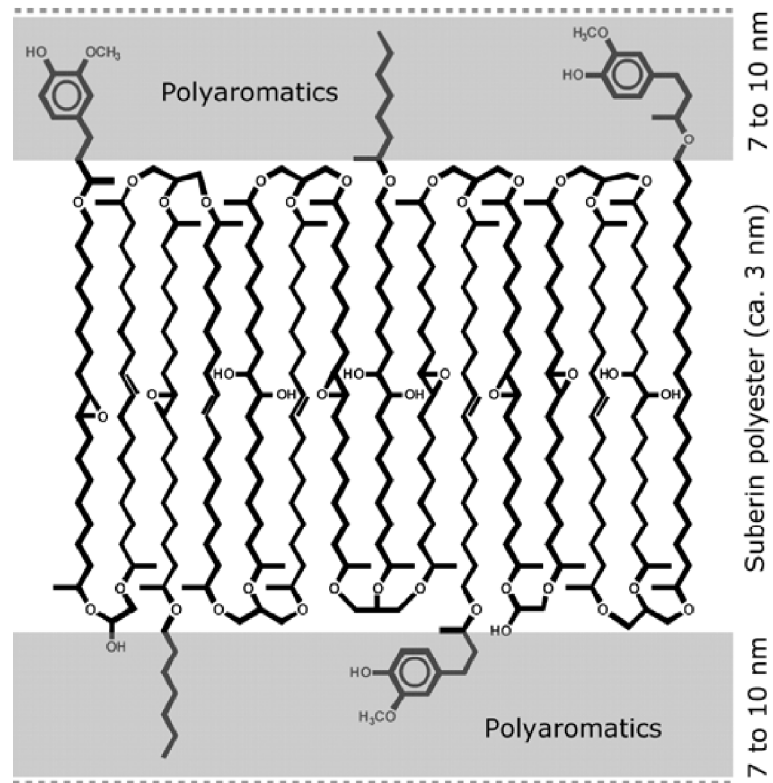


Figura 3 Model de l'estructura macromolecular de la suberina segons Graça i Santos (2007)

Les **ceres** són una barreja d'àcids grassos i derivats, que estan units amb enllaços hidrofòbics a la suberina i formen la fracció anomenada soluble o extractiva del periderma. Les ceres tenen un paper molt important en la funció protectora del fel·lema ja que l'extracció de les ceres va associada a un increment de 100 vegades en la permeabilitat hídrica (Schreiber *et al* 2005). La quantitat i composició de les ceres també és molt variable en funció del teixit, espècie i entorn. Tot i el paper rellevant de les ceres en la funció protectora del periderma, en la patata representen només el 4 % dels lípids totals i estan formades per quatre classes de substàncies: alcans, alcohols primaris, àcids grassos i esters de ferulat (Schreiber *et al* 2005).

	Kolattukudy i Agrawal (1974)*	Graça i Pereira (2000)†	Franke <i>et al</i> (2005) ‡	Serra <i>et al</i> (2009b) §	Järvinen <i>et al</i> (2009)
Monòmers					
1-Alcanols	11	4	13	18 ± 2	5
Àcids alcanòics	15	14	13	14 ± 2	7
Àcids α,ω- dicarboxílics	44	55	39	34 ± 2	47
ω-Hidroxiàcids	30	25	31	30 ± 1	38
Aromàtics	no calculat	2	4	4 ± 1	3

**S. tuberosum* cv Russet Burbank; tubercles madurs; extracció de ceres: solució 2:1 (metanol:cloroform); extracció de suberina: 48 h en BF₃ en metanol al 14 %

† Extracció de ceres: Soxhlet diclorur de metà (8 h), etanol (18 h), aigua (24 h) i metanol (18 h); extracció de suberina: reflux de 3 h en NaOCH₃ en metanol 12 mmol l⁻¹

‡*S. tuberosum* cv Desirée; tubercles de 28 dies; extracció de ceres: a 60°C, 24 h solució 1:1 (metanol:cloroform); extracció de suberina: 24 h a 70°C, en BF₃ en metanol al 10 %

§*S. tuberosum* cv Desirée; tubercles de 21 dies; extracció de ceres: 60°C, 24 h solució 1:1; (metanol:cloroform); extracció de suberina: 24 h a 70°C, en BF₃ en metanol al 10 %

||*S. tuberosum* cv Nikola; tubercles de 2 mesos (a 4°C); extracció de ceres: Soxhlet cloroform (10 h) i metanol (12 h); extracció de suberina: diversos mètodes d'extracció de suberina (es mostra la mitjana en els compostos de la suberina)

Taula 1 Percentatges relatius de cada classe de monòmer de la suberina en peridermes de tubercle de patata segons la literatura, on es derivatitza l'extracte amb BSTFA.

Espècie	Àcids								
	1-Alcanols* (C ₁₈ -C ₃₂)	Alcanoic† (C ₁₆ -C ₃₂)	α,ω-alcanodioic† (C ₁₆ -C ₃₂)	ω-hidroxi-alcanoic‡ (C ₁₆ -C ₃₂)	dihidroxi- hexadecanoic‡	Octadecanoic		Octadecaene-1,18-dioic	
						9,10-epoxi18- hidroxi§	9,10,18- trihidroxi‡	9,10- epoxi§	9,10-dihidroxi‡
<i>Quercus robur</i>	2,3	2,0	4,7	21,3	3,7	22,7	25,3	3,5	6,9
<i>Quercus ilex</i>	5,6	6,0	2,6	23,9	0,7	31,4	16,6	4,4	3,5
<i>Fagus sylvatica</i>	6,8	4,4	8,4	18,7	0,8	28,7	26,4	0,5	3,0
<i>Castanea sativa</i>	3,9	1,1	1,7	13,4	2,2	12,8	31,9	3,1	5,1
<i>Betula pendula</i>	TR	TR	8,0	21,6	4,2	15,9	29,1	TR	TR
<i>Quercus suber</i>	2,3	1,3	9,0	40,7	TR	15,3	5,4	15,9	7,8
<i>Acer griseum</i>	2,0	10,7	5,9	39,6	0,3	2,0	10,9	2,9	17,1
<i>Fraxinus excelsior</i>	9,5	7,9	15,2	24,3	TR	2,9	4,5	11,3	13,6
<i>Acer pseudoplatanus</i>	4,7	2,8	17,0	45,3	2,8	2,1	3,5	1,3	2,2
<i>Ribes nigrum</i>	6,2	4,0	20,2	49,7	2,9	1,2	1,6	TR	TR
<i>Euonymus alatus</i>	1,5	6,2	24,0	61,2	0,8	1,0	1,6	TR	TR
<i>Populus tremula</i>	2,3	6,2	27,1	54,5	1,9	0,5	1,1	TR	0,7
<i>Solanum tuberosum</i>	11,1	8,2	32,7	31,7	TR	0,5	TR	TR	1,5
<i>Sambucus nigra</i>	6,1	6,7	23,7	50,5	0,6	0,3	0,8	0,6	0,3
<i>Laburnum anagyroides</i>	1,5	1,5	21,7	48,6	9,4	0,3	1,2	TR	0,1
<i>Cupressus leylandii</i>	3,6	9,4	31,5	51,2	0,4	0,1	TR	TR	0,1

* Determinat per anàlisi GC dels corresponents derivats de trimetilsilil èter

† Determinat per anàlisi GC dels corresponents derivats de metil ester

‡ Determinat per anàlisi GC dels corresponents derivats de metil ester trimetilsilil èter

§ Determinat per anàlisi GC dels corresponents derivats de metoxihidrina metil ester trimetilsilil èter

|| També conté el 9,6 % d'α,ω-alkanodiols; composició homòloga a (%) 18:0 (13,1), 20:0(70,9), 22:0 (14,0) i 24:0 (2,0)

TR, traces

Taula 2 Variació en la composició de la suberina en 16 plantes (Holloway 1983). Els valors representen el percentatge del total dels monòmers.

Biosíntesi i organització macromolecular

El fet que deficiències o sobreexpressió de determinats enzims com l'aciltransferasa glicerol-3-fosfat GPAT5, la feruloïl transferasa d' ω -hidroxiàcids i alcohols FHT o la sintasa del 3-ketoacil-CoA StKCS6 tingui efectes similars en la composició química de ceres i suberina (Beisson *et al* 2007, Li *et al* 2007b, Serra *et al* 2009a, Serra *et al* 2010b), suggereix que la biosíntesi de ceres i suberina comparteix precursors d'àcids grassos. Per tant, hi ha indicis que existeix una via de biosíntesi prèvia, comuna. En moltes espècies, com és el cas de la patata i *Arabidopsis*, les ceres contenen compostos comuns amb el polièster com els alcohols i àcids grassos i, en funció de si estan units o no covalentment, formaran part de la fracció extraïble (ceres) o la insoluble (suberina). Les vies de síntesi dels components alifàtics de la suberina i les ceres són relativament ben conegudes (veure per exemple Bernards (2002) o Franke and Schreiber (2007) o Li-Beisson (2013) entre altres). La síntesi *de novo* d'àcids grassos s'inicia als plastidis (Figura 4, A i B). Es dona en totes les cèl·lules vegetals i comença amb la formació de malonil-CoA a partir d'acetil-CoA i bicarbonat. La producció d'àcids grassos de 16 i 18 carbonis s'obté a partir de les sintases d'àcids grassos que formen un complex multienzimàtic. L'acetil-CoA és utilitzat com a unitat iniciadora i el malonil-ACP subministra unitats de dos carbonis en cada etapa d'elongació. Per cada etapa d'elongació, cal que es donin les següents reaccions enzimàtiques: condensació -addició de dues unitats de carboni a la cadena creixent d'àcid gras-, dues reduccions i una deshidratació. L'elongació en el plastidi acaba amb l'eliminació de "l'acil-carrier protein (ACP)". En cas que convingui seguir elongant la cadena de l'àcid gras, aquesta s'esterificarà al coenzim A i l'elongació continuarà en el reticle endoplasmàtic (Figura 4, C i D). En l'elongació esmentada hi participa un altre complex multienzimàtic conegut com a FAE (*Fatty acid elongation*) i també tenen lloc quatre reaccions enzimàtiques consecutives (condensació, reducció, deshidratació i reducció). Una vegada obtingut l'àcid gras de cadena molt llarga, aquest podrà ser sotmès a diferents activitats enzimàtiques que permetran obtenir els diferents components de suberina i ceres a través de posteriors oxidacions, reduccions i esterificacions (Figura 4, C a E).

Durant el procés de suberització es produeix un flux massiu d'àcids grassos i derivats des del lloc de síntesi - el cloroplast i el reticle endoplasmàtic- a la paret, on es poden unir de forma covalent a través d'esterificacions o per enllaços hidrofòbics (Figura 4, F).

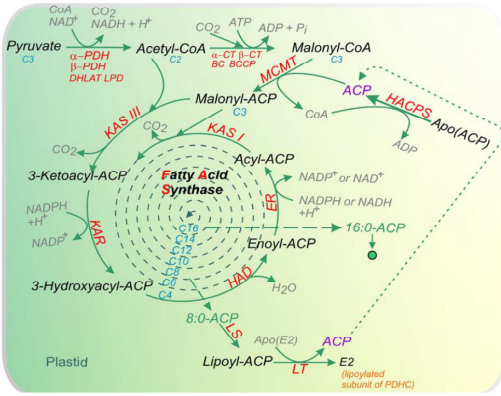
El domini aromàtic es diposita primer (Yang i Bernards 2007) i polimeritza a l'interior de la paret primària mentre la suberina alifàtica polimeritza per formar una matriu situada entre la paret primària i la membrana plasmàtica i les ceres es dipositen associades a la suberina alifàtica.

L'organització macromolecular de la suberina és complexa i encara ara desconeguda. Quan s'observa al microscopi electrònic de transmissió, la capa de suberina té un aspecte lamel·lar consistent en l'alternança de capes electrodenses -bandes fosques- i capes electrolúcides -bandes clares-. Hi ha diferents hipòtesis

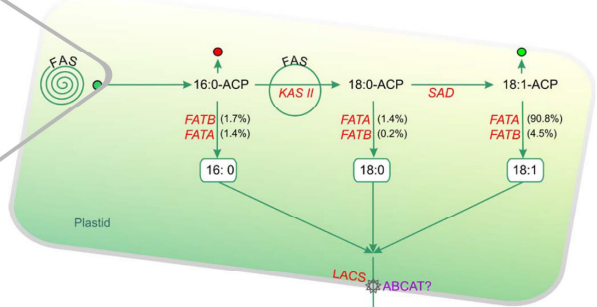
per explicar la possible organització macromolecular del polímer a la paret però encara no es coneix el significat d'aquestes bandes característiques de la ultraestructura. En general, s'especula que les bandes fosques contenen els components aromàtics -àcids hidroxicinàmics esterificats-, mentrestant les bandes clares contindrien només compostos alifàtics amb les ceres embegudes. En base a aquestes observacions i als resultats de la despolimerització parcial de la suberina, es va presentar un model en el qual els components glicerol-diàcid-glicerol són les unitats bàsiques per a l'organització tridimensional de la suberina i s'atribueix a l'àcid ferúlic del domini alifàtic la capacitat d'unir els dos dominis (Graça i Santos 2007). Tot i que la deficiència en diàcids de la suberina alifàtica va acompanyada d'una alteració en la disposició lamel·lar de la suberina (Serra *et al* 2009b), el fet que la disminució substancial del ferúlic en la suberina alifàtica no vagi acompanyada d'una alteració en la disposició lamel·lar de la suberina (Molina *et al* 2009, Serra *et al* 2010b) posa en evidència les contradiccions del model (vegi's revisió a Serra *et al* (2010a)).

Figura 4 Esquema dels processos de biosíntesi de suberina i ceres. A) És un detall de l'elongació d'àcids grassos als plastidis. B) Mostra el transport dels àcids grassos al reticle endoplasmàtic (ER). C) Representa els processos de síntesi de les diferents substàncies de les ceres l'ER. D) Representa la síntesi compostos alifàtics de la suberina. E) Mostra la síntesi de compostos aromàtics del domini alifàtic, que s'esterificaran amb els compostos alifàtics provinents de D). F) Mostra les possibles vies de transport dels components de la suberina des de l'ER a la paret cel·lular. La composició s'ha confegit a partir dels diagrames del treball de Li-Beisson *et al* (2013).

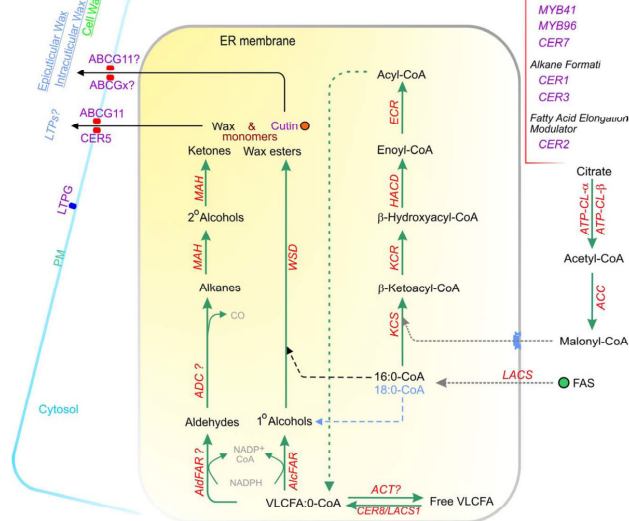
A)



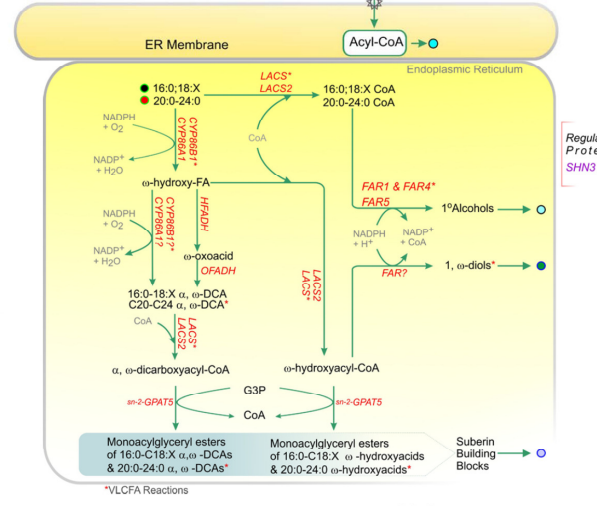
B)



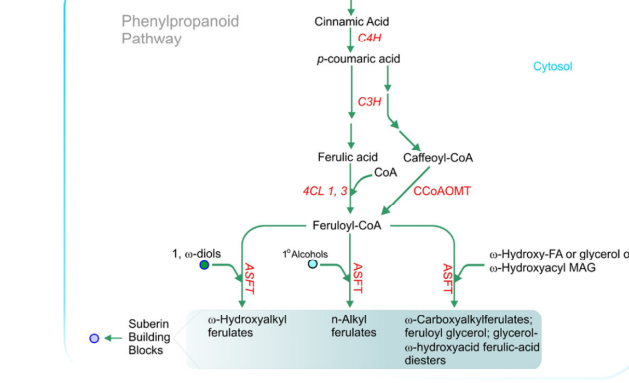
C)



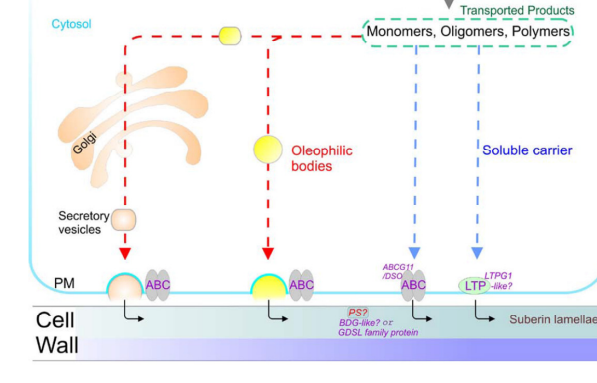
D)



E)



F)



Funció de barrera de la suberina i les ceres del periderma

Les ceres en el periderma de patata quantitativament representen una fracció molt petita dels lípids totals, no obstant, s'ha demostrat que juguen un paper important tant per a la textura com per a la permeància (Kerstiens 2006, Vogt *et al* 1983, Schreiber i Riederer 1996, Schreiber *et al* 2005). Si s'extreuen les ceres, els fragments de periderma aïllats (*membranes de periderma*) esdevenen més rígids i fràgils i n'augmenta la permeància a l'aigua, en alguns casos fins a 100 vegades (Vogt *et al* 1983, Schreiber *et al* 2005, Lenzian 2006). Per altra banda, el tractament amb tricloroacetat, que actua d'inhibidor de l'elongació dels àcids grassos durant la formació del periderma cicatricial de tubercle, produeix una gran disminució del contingut de ceres, i així impedeix que el periderma assoleixi el nivell de barrera òptim davant la deshidratació (Soliday *et al* 1979).

En el nostre laboratori, mitjançant el silenciament de determinats gens implicats en la biosíntesi de suberina i ceres hem pogut analitzar la contribució d'ambdós components en la funció barrera del periderma. Hem observat que el silenciament d'una elongasa de VLCFA (StKCS6) disminueix l'acumulació d'àcids grassos i derivats més grans de 28 carbonis, tant en ceres com en suberina, i també disminueix el contingut total de ceres. Aquesta disminució va associada a un augment en la permeància hídrica del periderma d'1,54 vegades (Serra *et al* 2009a), la qual cosa corrobora el paper protector de les ceres respecte la deshidratació del periderma. Per altra banda, el silenciament d'una ω -hidroxilasa d'àcids grassos (CYP86A33), disminueix els compostos majoritaris de la suberina (C18:1 ω -hidroxiàcid i C18:1 diàcid), redueix la càrrega total de suberina en un 60 % i incrementa al doble -respecte la salvatge- la càrrega total de ceres. Aquest canvi en la composició va lligat a un augment de 3,5 vegades en la permeabilitat hídrica del periderma i a una alteració de la suberina lamel·lar (Serra *et al* 2009b). Això demostra que la suberina també contribueix de forma significativa en la funció barrera, ja sigui pel canvi en la composició química, per la càrrega total de suberina o per l'alteració en la ultraestructura de la suberina. El silenciament d'una feruloïl transferasa d' ω -hidroxiàcids i alcohols (FHT) dóna lloc a una disminució d'èsters de ferulat tant en suberina, com en ceres i provoca un augment de 14 vegades en la permeància hídrica del periderma i una alteració en l'organització tissular del fel·lema (Serra *et al* 2010b). Per tal d'entendre millor com aquestes modificacions en les vies enzimàtiques de suberina i ceres poden afectar la paret cel·lular, s'ha analitzat els peridermes d'aquestes transgèniques mitjançant RMN en estat sòlid (Serra *et al* 2014). Hem observat que, quan es quantifiquen els components de les línies CYP86A33-RNAi i FHT-RNAi observades a través de RMN, aquestes presenten una major proporció de components hidròfils respecte a hidrofòbics. A més, a més, l'anàlisi per RMN del periderma de la línia FHT-RNAi tractada amb BF₃ (residu de la transesterificació) presenta una major proporció de compostos alifàtics i aromàtics, la qual cosa suggereix que el silenciament d'FHT té efectes també al domini aromàtic de la suberina i/o que la unió entre els components de la paret cel·lular es veu afectada (Serra *et al* 2014). També s'ha observat que els

peridermes d'*FHT-RNAi* són més fràgils i aquesta fragilitat es podria explicar per l'augment en els compostos aromàtics de la paret, que conferien una major rigidesa, la qual podria ser responsable de la gran pèrdua en la capacitat d'impermeabilització.

Un aspecte important a considerar és que la deposició de suberina i ceres, tant des del punt de vista quantitatiu com qualitatiu, es modula en funció de les necessitats de la planta. S'ha observat canvis en la quantitat i la composició relacionats amb l'estat fisiològic (edat) i canvis ambientals (Lendzian 2006). Encara no es coneix però, quins mecanismes reguladors intervenen per produir aquests ajustaments de la barrera a les necessitats canviants de l'organisme. En teixits suberitzats hi ha poca informació pel que fa als factors de transcripció que poden regular el procés de biosíntesi de suberina i ceres, i de moment només s'ha caracteritzat el patró d'expressió de factors de transcripció en barreres suberificades (Soler *et al* 2008, Lasserre *et al* 2008, Almeida *et al* 2013). És rellevant la publicació recent del treball de Kosma *et al.* (2014) on es caracteritza per primer cop un gen regulador del procés de suberització (*AtMYB41*). En aquest treball es transformen plantes d'*Arabidopsis* amb el gen *AtMYB41* sota control del promotor 35S. A diferència de les plantes salvatges, en les plantes transformades les cèl·lules del mesòfil i l'epidermis de les fulles presenten a la seva paret cel·lular les lamel·les associades a la deposició de suberina. Els autors confirmen per anàlisi química, la presència de monòmers característics de la suberina en fulla. Aquesta acumulació ectòpica de suberina es correlaciona amb la inducció dels corresponents gens de biosíntesi. En canvi, pels teixits cuticulars s'han identificat molts més factors de transcripció (veure revisió de Yeats and Rose (2013)). S'ha caracteritzat el WIN1/SHN1 (*Wax Inducer 1/Shine1*) que activa els promotors de diversos gens de biosíntesi de cutina. El MYB106 i MYB16 actuarien de forma similar a WIN1/SHN1. Per altra banda, també s'ha identificat factors de transcripció que responen a estressos ambientals i que regulen la deposició de ceres cuticulars, com seria el cas de MYB30 i MYB96 que responen a patògens i ABA respectivament. MYB41 en canvi regula negativament la deposició de cutina sota estressos ambientals. També s'ha observat que proteïnes que contenen el domini WW i HD-ZIP IV tenen capacitat de regular la deposició dels lípids dels teixits cuticulars.

Identificació d'un factor de transcripció NAC expressat diferencialment en suro

El periderma d'escorça de surera (o suro) és un dels grans paradigmes del teixit suberitzat degut a l'abundància de teixit suberitzat que genera. Així doncs, per tal d'identificar els gens induïts en el suro, es va obtenir una genoteca d'hibridació substractiva i de supressió (SSH) amb cDNA de suro viu com a teixit d'interès i cDNA de massa proliferativa d'embrió somàtic per sostreure els cDNAs de gens constitutius (Soler *et al* 2007). Aquesta genoteca, per tant, estava enriquida en gens amb major expressió en el suro i tots els clons obtinguts es van imprimir en un *array* per tal de veure quins gens d'aquesta genoteca tenien major expressió a suro respecte a lleny. Aquesta comparació va evidenciar que la via biosintètica de compostos alifàtics estava regulada positivament al suro, mentre que la via dels compostos aromàtics no mostrava unes diferències tan marcades. Aquesta estratègia combinada de genoteca SSH+microarray va aportar bons gens candidats de la biosíntesi de suberina i ceres com *elongases d'àcids grassos*, *ω-hidroxilases d'àcids grassos*, *feruloil-transferases*, *glicerol-3-fosfat acil transferases* i *lipases GDSLs* entre altres. La identificació de l'ortòleg de patatera i el silenciament d'alguns d'aquests gens en patatera van evidenciar la implicació de l'*elongasa StKCS6*, l'*ω-hidroxilasa CYP86A33* i la *feruloil transferasa FHT* en la biosíntesi de la suberina en tots els casos, i la biosíntesi de les ceres en el primer i el tercer casos (Serra *et al* 2009a, Serra *et al* 2009b, Serra *et al* 2010b). Així mateix es va demostrar que la pèrdua d'aquestes activitats enzimàtiques es correlacionava amb una pèrdua en la capacitat protectora del periderma. Per tant, aquests resultats en patata confirmen que l'estratègia experimental utilitzada en surera aportava dades rellevants sobre el fel·lema. El treball de transcriptòmica de surera també va destacar altres gens que estaven induïts al suro respecte al lleny i que corresponien a categories de gens relacionats amb estrès o gens reguladors. En el grup de reguladors es van identificar factors de transcripció, cinases, fosfatases i proteïnes de la regulació del proteassoma. Entre els factors de transcripció identificats hi va haver *WRKY*, *MYB* i gens de la família *NAC*. D'aquests, destacava un gen *NAC* que presentava una inducció clara a fel·lema respecte a xilema i que al llarg de l'època de creixement en el fel·lema de surera presentava un màxim d'inducció el Juny, mes en el qual el fel·logen experimenta la màxima activitat (Soler *et al* 2008). Val la pena remarcar que gens de biosíntesi de la suberina com *GPAT5*, *FHT* i la *ω-hidroxilasa d'àcids grassos CYP86A32* també presentaven un perfil d'acumulació de transcrit similar al del gen *NAM*. Així doncs, a partir dels ESTs obtinguts per Soler *et al* (2007) i la informació disponible a les bases de dades es va obtenir la seqüència codificant sencera del gen de patatera i es va procedir a silenciar i sobreexpressar aquest gen en patatera per tal d'analitzar els efectes fenotípics del gen (Soler 2008). A partir del treball de Singh *et al* (2013) el gen objecte d'aquesta tesi es va anomenar *StNAC103*.

El model de patatera per a l'estudi de teixits suberitzats

El periderma de patata constitueix també un teixit fortament suberitzat, de fàcil obtenció i manipulació. A més, els processos relacionats amb el tubercle de patatera, per la seva importància, han estat estudiats de manera molt extensa. La formació d'aquest òrgan subterrani d'emmagatzematge de midó es dona a partir de la modificació d'una tija. En aquest procés es concatenen una sèrie d'etapes d'inducció, iniciació, creixement, dormició i brotada, complexes, de les quals s'extreu la hipòtesi que estan controlades per interaccions genètiques específiques (Ferne i Willmitzer 2001). El periderma del tubercle constitueix el principal teixit de defensa contra patògens i insectes i per aquest motiu també ha estat àmpliament caracteritzat, tant el natiu com el cicatricial (Artschwager 1927, Graça i Pereira 2000, Sabba i Lulai 2002, Schreiber *et al* 2005, Lulai 2007).

La patatera (*S. tuberosum*) pertany a la família de les Solanàcies i al gènere *Solanum*, que engloba aproximadament 1500 espècies, entre les quals diverses espècies amb un gran interès i utilització per part de la humanitat, com per exemple la tomaquera (*S. lycopersicum*) o l'albergínia (*S. melongena*). *S. tuberosum* és un dels conreus més importants del món, després de l'arròs (*Oryza sativa*), el blat (*Triticum aestivum*) i l'ordi (*Hordeum vulgare*). La publicació dels genomes de patata (The Potato Genome Sequencing Consortium *et al* 2011)—concretament del grup Phureja-, i tomàquet (The Tomato Genome Consortium *et al* 2012) fan d'elles un model interessant per estudiar diversos fenòmens biològics en plantes. A més, la família de les Solanàcies és única degut que no presenta esdeveniments de duplicació a gran escala dins el seu genoma, des de la seva radiació. En patatera i tomaquera tots els esdeveniments de poliploidia daten de temps recents, de manera que és fàcil identificar i estudiar gens ortòlegs. En referència a la patatera, és un organisme que la major part de les seves varietats són autotetraploides, molt heterozigotes i que pateixen una gran depressió de consanguinitat. La seva poliploidia va representar una dificultat a l'equip que en va plantejar la seqüenciació. Això es va resoldre mitjançant l'ús d'una varietat diploide anomenada *S. tuberosum* Grup Phureja, de la qual es va obtenir un organisme doble monoploide (DM) de forma natural, tal com descriuen Paz i Veilleux (1999).

S. tuberosum presenta una gran variabilitat —en forma de subespècies i varietats de cultiu— deguda a les adaptacions ambientals, la majoria de les quals, adquirides a la regió dels Andes i l'Amazònia, i que conserven entre elles un genoma molt similar. La subespècie *andigena* per exemple, és un bon model perquè es pot induir la tuberització per fotoperíode i així sincronitzar la formació de tots els tubercles, i poder obtenir mostres homogènies pel que fa a etapes del desenvolupament del tubercle.

Diversos estudis previs (Serra *et al* 2010b, Boher *et al* 2013) avalen el potencial del model de patatera per a l'estudi de gens involucrats en la síntesi de suberina. Així, el model de patatera és interessant perquè permet obtenir mostra de teixit suberitzat -periderma de tubercle, endoderma i exoderma de l'arrel, capa de tancament de ferides i teixit cicatricial- a un ritme ràpid en comparació a *Q. suber*. Alhora, és fàcil obtenir línies clonals de plantes modificades genèticament per a utilitzar en estudis de genètica inversa i poder ser manipulades *in vitro*.

En contraposició, el model d'*Arabidopsis thaliana*, que també és usat, ofereix un volum major d'informació disponible, tant pel que fa a estudis realitzats, com pel que fa a bases de dades i eines bioinformàtiques per a l'aproximació dels problemes que es plantegen en la recerca. Tanmateix, *Arabidopsis* no produeix un teixit amb tanta quantitat de suberina, ni tan fàcil d'aïllar com el periderma de tubercle de patatera. L'aïllament del periderma de patatera facilita molt l'anàlisi de la composició química i permet l'anàlisi quantitativa de la permeància hídrica del periderma, a més de permetre obtenir un teixit molt pur per a estudis d'expressió gènica en comparació a *Arabidopsis*.

Objectius

La comprensió dels processos biològics que duen a la formació de teixit suberitzat són l'eix central de la recerca en el nostre laboratori. En aquest context es va identificar un conjunt de gens que s'indueïen en teixits suberitzats com el suro o la pela de la patata (Soler *et al* 2007, Soler *et al* 2011), per alguns dels quals es va poder demostrar la implicació en la funció barrera del fel·lema i concretament la síntesi de la suberina o ceres mitjançant el silenciament gènic en patatera (Serra *et al* 2009a, Serra *et al* 2009b, Serra *et al* 2010c). Aquestes aportacions se sumen al coneixement de la via de biosíntesi de la suberina i als avenços realitzats en els últims anys en mutants d'*Arabidopsis* (Pollard *et al* 2008, Li-Beisson Y 2013, Nawrath *et al* 2013). Malgrat que la publicació del transcriptoma de suro i de pela de patata va apuntar a possibles candidats de la regulació de teixits suberitzats, hi ha pocs treballs en què es caracteritzin factors de transcripció claus per la suberina. De fet, es va publicar que els factors de transcripció *SHINE* i les seves dianes no estan només implicats en l'assemblatge de la cutina, sinó que és probable que tinguin un paper en la deposició de suberina de l'arrel (Shi *et al* 2011). No obstant, aquestes afirmacions es basen en resultats de transactivació de *FAR1*, tant per *SHN1*, *SHN2* com *SHN3*. *FAR1* està implicada en la biosíntesi dels alcohols primaris de la suberina (Domergue *et al* 2010). La caracterització del perfil d'acumulació de transcrit de *QsMYB1* (Almeida *et al* 2013) va reforçar el paper d'aquest factor de transcripció en teixits suberitzats que s'havia suggerit en el treball de Soler *et al* (2007). Recentment s'ha publicat un estudi (Kosma *et al* 2014) on la sobreexpressió d'*AtMYB41* provoca l'acumulació ectòpica de suberina i l'activació de gens de la biosíntesi d'aquest polímer. En el "Laboratori del suro" es va identificar *StNAC103* com a bon candidat del fel·lema de surera ja que s'indueïa en aquest teixit respecte al de massa proliferativa d'embrió somàtic i respecte a xilema (Soler *et al* 2007); i durant l'estació de creixement en el fel·lema presentava màxima acumulació de transcrit el Juny, que és el mes en què es dona la màxima producció del suro (Soler *et al* 2008). A més, el pic d'expressió del gen NAC es correlaciona amb el de gens de la biosíntesi de suberina, com són *HCBT/FHT*, *CYP86A32* i *GPAT5*. És per tot això que a partir de l'EST identificat en surera es va obtenir la seqüència codificant sencera de patata i es van obtenir línies de sobreexpressió i silenciament en patatera (Soler 2008) per tal d'analitzar els efectes d'*StNAC103* en el fel·lema de la patata. Donat que *StNAC103* forma part d'una família multigènica es va procedir a fer dos tipus de silenciaments: un dirigit contra una zona específica del gen i l'altre contra una zona conservada. Aquesta triple estratègia de genètica inversa permetria determinar si hi havia efecte amb el silenciament específic del gen. En cas que això no fos possible degut a la complementació per un o varis paràlegs, es podria veure l'efecte amb la línia de sobreexpressió o amb el silenciament conservat (Soler 2008). En el moment d'iniciar aquesta treball, ja es disposava de les línies transgèniques estables, les quals han estat una eina bàsica per a aquesta tesi.

Amb tots aquests precedents, el que es pretén en última instància en aquesta tesi és entendre millor la funció del gen *StNAC103* en els teixits suberificats i en especial en el fel·lema de la patata.

Els objectius d'aquesta tesi són els següents:

1) Analitzar *in silico* el gen i la proteïna *StNAC103* (Capítol 1):

- I. Caracteritzar l'estructura del gen en referència a la seva composició d'introns, exons, i elements reguladors en *cis*.
- II. Caracteritzar la seqüència proteica d'*StNAC103* en relació als motius conservats respecte altres proteïnes NAC; la predicció de propietats fisicoquímiques de la proteïna, possibles modificacions post traduccionals i de l'estructura secundària i terciària.
- III. Comparar les similituds i diferències de la seqüència proteica d'*StNAC103* respecte altres proteïnes NAC.

2) Analitzar l'efecte del silenciament i la sobreexpressió d'*StNAC103* sobre el fenotip del periderma (Capítol 2):

- I. Determinar si la sobreexpressió o el silenciament -específic i conservat- d'*StNAC103* indueixen canvis que afectin el perfil de lípids i la càrrega total de ceres i suberina del periderma del tubercle.
- II. Analitzar si els tubercles silenciats per *StNAC103* presenten canvis fenotípics a nivell d'organització del teixit i disposició lamel·lar de la suberina (estructura i ultraestructura).
- III. Determinar la capacitat d'*StNAC103* per influir en la fisiologia del periderma, mitjançant la comparació de la permeància hídrica de les línies de sobreexpressió amb la línia salvatge.

3) Estudiar el perfil d'acumulació de transcrit i l'activació del promotor del gen *StNAC103*. Comparar el perfil d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* amb el de dos gens de la biosíntesi de suberina (Capítol 3):

- I. Determinar el perfil d'acumulació de transcrit *in silico* a partir de les bases de dades disponibles de patata i Arabidopsis.
- II. Determinar *in silico* els gens que co-expressen amb *StNAC103*.
- III. Analitzar el perfil d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en teixits constitutius mitjançant PCR a temps real.
- IV. Obtenir línies transgèniques de patatera transformades amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP*.
- V. Analitzar la capacitat de la ferida per induir l'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en fulla i tubercle de patata, així com també la dels gens *CYP86A33* i *FHT*.
- VI. Determinar la localització cel·lular de l'activació del promotor d'*StNAC103* en tubercle, arrel i teixit cicatricial de patates transformades amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP*.

Capítol 1

StNAC103: el gen i la proteïna

Sumari

Objectiu: Extreure informació rellevant sobre StNAC103, a partir de les bases de dades disponibles per tal de caracteritzar millor el gen i la proteïna. Es pretén predir els elements reguladors en cis del promotor, caracteritzar l'estructura del gen i predir la possible estructura tridimensional de la proteïna, així com detectar motius conservats i la tipologia de modificació post traduccional. En paral·lel, comparar la seqüència d'StNAC103 amb les seqüències homòlogues més properes.

Metodologia: Submissió de la seqüència nucleotídica o proteica a les bases de dades o eines bioinformàtiques adequades per obtenir informació *in silico* del gen i la proteïna d'StNAC103. Comparació d'aquestes dades amb les obtingudes per a altres NAC rellevants. Confecció d'un filograma respecte StNAC103 amb seqüències d'altres NAC d'interès.

Resultats i conclusions: Amb les anàlisis que s'han dut a terme, es prediu que StNAC103 té un domini NAC clàssic i un domini TAR. Les prediccions *in silico* suggereixen localització nuclear de la proteïna i un temps de vida mitjà alt. A més s'ha predit senyals d'exportació nuclear i té dianes de fosforilació, glicosilació i sumoilació. En canvi, no s'han predit dianes per a miRNAs. La seqüència proteica conté sis motius conservats entre la família NAC de patatera en el seu domini TAR -a banda dels clàssics subdominis conservats A-E del domini NAC-. Es compara el grau d'homologia de la proteïna amb altres espècies i en la patatera.

1.1. Introducció

Els gens de la família de factors de transcripció NAC presenten una gran diversitat de seqüència i de funcions fisiològiques i moleculars, per la qual cosa, és interessant comprovar la relació filogenètica i les característiques comunes d'*StNAC103* respecte la resta de NACs. Els gens d'aquesta família contenen dos dominis principals: el domini NAC i el domini TAR (*Transcriptional Activation Region*), els quals estan en posició N i C-terminal de la proteïna, respectivament. Al domini NAC se li atribueix la funció d'unió al DNA, és el més conservat i ha estat utilitzat en alguns estudis per classificar les principals subfamílies de gens NAC. El domini TAR està implicat en l'activació de la transcripció i és més variable.

El domini NAC inicialment va ser caracteritzat a partir de la seqüència consens entre els gens *NAM* de petúnia, *ATAF 1 i 2*, i *CUC 2*, d'*Arabidopsis*. Aquest domini comprèn 160 residus dividits en quatre subdominis A-D i alguns gens de la família en presenten un cinquè, E (Kikuchi *et al* 2000, Duval *et al* 2002, Ooka *et al* 2003, Zhu *et al* 2012) (Figura 6). Els subdominis més conservats són A, C i D, mentre que B i E són més variables (Ooka *et al* 2003). Pel què fa a composició, els subdominis C, D i E són rics en aminoàcids bàsics (R, K i H), i en canvi, el subdomini B és ric en aminoàcids àcids. Les funcions que té cada subdomini són encara força desconegudes, i malgrat que hi ha una certa variabilitat en els residus, es conserven les propietats químiques en unes posicions determinades. Concretament s'ha observat que la dimerització es produeix en aminoàcids conservats del subdomini A, a través de ponts salins, (Ernst *et al* 2004) i s'ha identificat els aminoàcids arginina i glutamat com a claus per la formació d'homodímers i heterodímers (Xie *et al* 2000, Olsen *et al* 2004, Hegedus *et al* 2003). Entre els subdominis C i D s'ha trobat una regió rica en aminoàcids carregats positivament que faria la funció de marcador per a la localització nuclear (*Nuclear Localization Signal*) (Kikuchi *et al* 2000). Pel que fa als subdominis implicats en la unió a DNA, es va demostrar que els subdominis D i E tenen un paper important en la unió d'*ATAF 1 i 2* al DNA (Olsen *et al* 2005a). Es creu que petites variacions en aquesta regió poden afectar l'especificitat d'unió al DNA i per tant, el reconeixement de les seves dianes (Taoka *et al* 2004). Pel que fa a estructura, el domini NAC consta d'un grup de cadenes antiparal·leles que configuren un full β molt en torsió. A més, aquest full β queda empaquetat tridimensionalment enmig de dues hèlix α -formades a partir de l'extrem N-terminal del domini NAC-, una de més llarga en una banda, i una de més curta a l'altra (Ernst *et al* 2004). Tot i que el subdomini d'unió a DNA pròpiament és desconegut, en l'estructura tridimensional, els dominis NAC presenten una superfície amb profusió de càrregues positives, la qual cosa els fa candidats a aquesta tasca.

Tot i que com s'ha comentat prèviament, la regió TAR és molt més variable que la NAC, també conté aminoàcids conservats (Zhu *et al* 2012). S'ha descrit que de forma habitual, en algunes regions TAR d'eucariotes es troben abundants repeticions d'un sol aminoàcid, sobretot residus àcids (Aida *et al* 1997, Duval *et al* 2002, Hegedus *et al* 2003). En aquesta regió s'ha trobat subdominis conservats molt curts (Duval

et al 2002), generalment compartits entre els gens de la mateixa subfamília (Zhu *et al* 2012) però que també poden ser conservats entre diferents subfamílies NAC. També dins de la regió TAR s'ha trobat dominis transmembrana o de localització per a importació/exportació a nucli (Olsen *et al* 2004). Referent a l'estructura de les TAR, de forma general presenten una baixa complexitat, de manera que no es formen estructures secundàries i terciàries *a priori* (Jensen *et al* 2009).

Les proteïnes NAC s'uneixen al promotor dels gens que regulen a través dels elements reguladors en *cis* anomenats NACRs (NAC Recognition Sequence). Malgrat que la seqüència de NACRs és variable en funció de les proteïnes NAC estudiades, en alguns casos s'ha definit un nucli que, de forma general, és ACGT o ACGC. Tran *et al* (2004) defineixen el nucli CACG a partir de l'estudi de les proteïnes ANAC055, ANAC019 i ANAC072 i per mitjà del mètode de *Yeast One-Hybrid* (TCnnnnnnnACACG, amb CACG com a nucli). Xue (2005) va estudiar la interacció de la proteïna TaNAC69 amb el DNA a través de la fusió de TaNAC69 amb cel·lula D marcada amb 6×His (CELD) ([AG]G[AT]NnCGT[AG]NNNNN[CT]ACGT[AC]A[CT][CT] per a TaNAC69). Olsen *et al* (2005a) identifiquen la zona del DNA que interacciona amb ANAC019 i ANAC092 i defineix el nucli CGT[GA], ([TA][TG]nCGT[GA] per a ANAC019 i T[TAG][GA]CGT[GA][TCA][TAG] per a ANAC092 mitjançant el mètode CASTing i gel de retardament. Balazadeh *et al* (2011), per a ORS1, va identificar la seqüència d'unió al promotor mitjançant la fusió CELD-DBP (RCGTR i RYACGCAA) i Xie *et al* (2000), ho van fer pel sistema del *One-Hybrid* (CTGACGTA i GATGACGC) per a AtNAC1. Posteriorment aquest motiu es va posar a prova mitjançant modelatge tridimensional (Zhu *et al* 2014b).

L'ortòleg de *Quercus suber* d'*StNAC103* va ser identificat per primera vegada per mitjà d'una genoteca d'hibridació substractiva i de supressió (SSH) fent servir cDNA de fel·lema viu d'escorça com a teixit d'interès i cDNA d'embrió somàtic de surera com a teixit control (Soler *et al* 2007). D'aquesta genoteca se'n va imprimir els gens que la constituïen en un *microarray* que es va utilitzar per hibridar els transcriptomes de xilema i fel·lema. L'estudi citat va permetre identificar diversos gens que estan induïts en fel·lema, entre els quals l'ortòleg d'*StNAC103*. Per obtenir la seqüència sencera d'*StNAC103* es van dissenyar encebadors a partir de la informació disponible dels possibles ortòlegs de patata i *Arabidopsis* de *QsNAC* i es va amplificar selectivament a partir de cDNA de fel·lema de patata (Soler 2008). Un cop obtinguda la seqüència sencera de la zona codificant d'*StNAC103* es va obtenir un fragment de 1227 bases del promotor mitjançant el *kit GenomeWalker* (Soler 2008). La seqüenciació del genoma de patata ha permès disposar d'un fragment més llarg del promotor (The Potato Genome Sequencing Consortium *et al* 2011). La nomenclatura *StNAC103* s'ha adoptat arran de la publicació d'un estudi que tracta de la distribució en el genoma de *Solanum tuberosum* de la família NAC de factors de transcripció (Singh *et al* 2013).

1.2. Material i mètodes

Bases de dades i eines bioinformàtiques

Per a les prediccions *in silico* s'ha utilitzat la seqüència codificant i el fragment del promotor de 1227 bases obtinguts per Soler (2008). A més, i quan s'ha considerat adient, s'ha utilitzat un fragment més a 5' del promotor que correspon a la seqüència disponible del genoma de patata (PGSC0003DMG400005384). La seqüència aminoacídica s'ha obtingut amb traducció de la seqüència nucleotídica a l'ExPASy.

En concret s'han usat les següents eines bioinformàtiques:

- Aliniament de seqüències:
 - Multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, Corpet (1988)
- Predicció d'elements reguladors en *cis*:
 - Plant Care: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>, Lescot *et al* (2002)
 - PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>, Higo *et al* (1999)
- Predicció de propietats fisicoquímiques de la proteïna:
 - http://web.expasy.org/compute_pi/, Wilkins *et al* (1999)
- Identificació i anàlisi de motius:
 - InterProScan: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>, Goujon *et al* (2010)
 - ExPASy Prosite (ExPASy Proteomic Server): http://ca.expasy.org/cgi-bin/dna_aa, de Castro *et al* (2006)
 - MEME: <http://meme.nbcr.net/meme/>, Bailey and C. (1994).
- Predicció d'estructura tridimensional (secundària i terciària):
 - FUGUE: <http://tardis.nibio.go.jp/fugue/prfsearch.html>, Shi *et al* (2001).
 - HMMTOP: <http://www.enzim.hu/hmmtop/>, Tusnady and Simon (1998).
 - InterProScan: (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>, Quevillon *et al* (2005).
 - NetPhosK: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>, Blom *et al* (2004) als servidors TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.
 - DAS-TMfilter: <http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html>.
 - Phyre: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>, Kelley and Sternberg (2009).
 - CFSSP: <http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>, Fasman (1989).
 - COILS/PCOILS: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>, Lupas *et al* (1991).
 - MARCOIL: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil>, Delorenzi and Speed (2002).
 - POODLE: <http://mbs.cbrc.jp/poodle/poodle-s.html>, Shimizu *et al* (2007).
 - EsyPred: <http://www.unamur.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>, Lambert *et al* (2002).
 - I-TASSER: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, Roy *et al* (2010).
- Predicció de la localització subcel·lular:
 - WolfPsort: <http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>, Horton *et al* (2007).

- ESLPred: <http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/>, Bhasin and Raghava (2004).
- TargetP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, Emanuelsson *et al* (2007).
- iPSORT: <http://ipsort.hgc.jp/>, Bannai *et al* (2002)
- Predicció de les modificacions post traduccionals:
 - Eines de predicció GPS (CUCKOO workgroup): <http://www.biocuckoo.org/>.

Les eines esmentades han estat utilitzades amb els paràmetres per defecte. S'ha seleccionat, quan era necessari, l'organisme *S. tuberosum* o l'especificació taxonòmica més propera que el programa deixés triar, com a objectiu.

Construcció d'un filograma en relació a StNAC103

L'arbre filogenètic s'ha construït a través dels alineaments de les seqüències aminoacídiques realitzats amb el programari MAFFT (Carroll *et al* 2007), amb el mètode L-INS-i. Les seqüències mostraven una identitat mitjana del 44,0 %. S'ha utilitzat el mètode de *Neighbor-Joining* per a la confecció de l'arbre, amb el programa MEGA5 (Tamura *et al* 2011). Els paràmetres d'elecció han estat un *bootstrap* de 2000, el model de substitució JTT, una distribució gamma d'1 per a les taxes de substitució i el mètode *Pairwise Deletion* per als espais. Per tal de discutir quines seqüències tenen un arrelament diferent, s'ha escollit un percentatge de *bootstrap* de 85 o superior.

1.3. Resultats

Seqüència del gen: Promotor i ORF

L'alineament de la seqüència codificant sencera d'*StNAC103* s'ha comparat amb la de *S. tuberosum* grup Phureja mitjançant el Multalin i ha permès trobar dos introns dins de l'ORF de la seqüència d'*S. tuberosum* grup Phureja, que engloben les posicions de 155 a 1118 (964 b) i de 1391 a 2040 (650 b). La comparació de les dues regions codificants dóna com a resultat una homologia d'un 98,41 %. En la regió codificant s'ha trobat 17 diferències nucleotídiques en total: dues en la zona conservada (domini NAC) i les altres 15 en la regió variable del gen (domini TAR). La regió del promotor seqüenciada dóna una homologia d'un 100 % respecte el gen de *S. phureja* (Figura 5).

La predicció d'elements reguladors en *cis* del promotor d'*StNAC103* s'ha dut a terme mitjançant les eines PlantCare i PLACE sobre una seqüència de 2276 bases. Les caixes reguladores predites es mostren a la taula 3. Cal tenir en compte que no tots els elements en *cis* predits han d'ésser funcionals. De tota manera, la presència de diversos grups de regulació amb nombroses caixes cadascun fa possible una predicció dels estímuls que probablement regulen l'expressió d'*StNAC103*. Val la pena esmentar que no sempre es troben les mateixes caixes en el PlantCare i el PLACE, raó de més que evidencia que la regulació a través d'aquests estímuls s'ha de demostrar de manera experimental. A nivell global, quan es té present les prediccions d'ambdues, s'observa que hi pot haver regulació per estrès biòtic, abiòtic (fred, sequera i sal), per llum i per ritme circadià. A nivell hormonal s'observa que el gen pot respondre segons aquestes prediccions a àcid abscísic, etilè, gibberel·lines, auxines i àcid salicílic. A nivell tissular es troba predicció d'inducció en arrel, cèl·lules de guarda, llavor, pol·len, teixit vascular, meristemes i endosperma. S'ha predit també lloc d'unió a proteïnes Dof, WRKY, bZIP i WUS. S'han trobat elements reguladors en *cis* relacionats amb cicle cel·lular, la majoria dels quals són activats per citoquinines.

Figura 5 Alineament de les seqüències nucleotídiques (promotor i ORF) d'*StNAC103* i el seu possible ortòleg a *Solanum tuberosum* Grup Phureja (Sp) i traducció aminoacídica de la seqüència d'*StNAC103*. La seqüència codificant es mostra en negreta, el motiu NAM està requadrat en verd, la zona seleccionada pel silenciament conservat i específic es presenta en taronja i marró respectivament (capítol 2). En lila es troba la seqüència corresponent als introns; i els codons d'inici i final estan ressaltats en groc. El domini NAC correspon als primers 153 aa i el domini TAR va de l'aa 154 al final (334). S'ha subratllat la zona usada en l'encebador directe per a clonar el promotor fusionat amb les proteïnes delatores GUS/GFP (capítol 3).

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat (PlantCare)*	Quantitat (PLACE)
Estrès					
	Resposta a inductor fúngic	Box-W1	TTGACC	1	1
	Involucrat en la resposta a l'estrès	HSE	AAAAAATTTTC	1	
	Involucrat en la defensa i la resposta a l'estrès	TC rich repeats	RTTTTCTTRR	3	
	Lloc d'unió a OsBIHD1, que actua en resposta a l'estrès	BIHD1OS	TGTC A		9
	Resposta a patògens i sal	GT1GMSCAM4	GAAAAA		7
	Resposta a dessecació (descobert en MYBs)	MYB1AT	WAACCA		1
	Resposta a dessecació (descobert en MYBs)	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG		1
	Resposta a dessecació (descobert en MYBs, via de les flavones)	MYBCORE	CNGTTR		1
	Estrès abiòtic (fred)	MYCCONSUSAT	CANNTG		16
Hormones					
ABA	Resposta a l'àcid abscísic	ABRE	TACGTG	1	1
AUX	Resposta a les auxines	CATATGGMSAUR	CATATG		2
Etilè	Resposta a l'etilè	ERE	ATTTCAAA	2	3
GA	Resposta a gibberel·lines	TATC-box	TATCCAT	1	
	Resposta a gibberel·lines	CACTFTPPCA1	YACT		46
SA	Resposta a l'àcid salicílic	TCA-element	TCAGAAGAGG	2	
Llum/ritme circadià					
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AE-box	AGAAACAA	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AT1-motif	ATTAATTTTACA	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	GA-motif	ATAGATAA	1	21
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	Gap-box	CAAATGAARA	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	I-box	cCATATCCAAT	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	TCT-motif	TCTTAC	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	chs-CMA1a	TFACTTAA	1	
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	chs-CMA2a	TCACTTGA	1	
	Part d'un mòdul conservat de resposta a la llum	Box 4	ATTAAT	6	
	Resposta a la llum	Box I	TTTCAAA	5	
	Resposta a la llum	Box II	TGGTAATAA	1	
	Resposta a la llum	G-Box	CACGTA	2	

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat (PlantCare)*	Quantitat (PLACE)
	Resposta a la llum	GT1-motif	GGTTAA	3	2
	Resposta a la llum	INRNTPSADB	YTCANTYY		5
	Resposta a la llum (present en fitocroms)	SORLIP1AT	GCCAC		3
	Resposta a la llum (present en fitocroms)	SORLIP2AT	GGGCC		1
	Resposta a la llum (negativa)	HDZIP2ATATHB2	TAATMATTA		2
	Lloc d'unió de MYB de patata. Present en gens de repressió de sucre i resposta a la llum	MYBST1	GGATA		6
	Control del ritme circadià	Circadian	CAANNNNATC	2	2
	Control del ritme circadià	NODCON1GM	AAAGAT		1
	Control del ritme circadià	NODCON2GM	CTCTT		10
Especificitat tissular					
Arrel	Lloc d'unió de RAV-1A (específic d'arrel i rosetes)	RAV1AAT	CAACA		4
	Lloc d'unió de RAV-1B (específic d'arrel i rosetes)	RAV1BAT	CACCTG		1
	Especificitat tissular (pèls-arrel)	RHERPATEXPA7	KCACGW		2
	Especificitat tissular (arrels)	SP8BFIBSP8BIB	TACTATT		2
Cèl·lules de guarda/Tubercle	Especificitat tissular (cèl·lules de guarda. Patata)	TAAAGSTKST1	TAAAG		7
Xilema	Identificat en gens involucrats en la formació del xil·lema	XYLAT	ACAAAGAA		1
Vascular	Especificitat tissular. Vascular. Trobat en inducció d'auxines (gen rolB)	NTBBF1ARROLB	ACTTTA		3
Meristemes	Relacionat amb meristemes	CAT-box	GCCACT	1	
Endosperma	Involucrat en l'expressió a l'endosperma	GCN4 motif	TGWGTCA	2	1
	Requerit per expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	5	
	Involucrat en l'expressió a l'endosperma	CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG		8
Llavors	Especificitat tissular (llavor)	RYREPEATBNNAPA	CATGCA		1
	Especificitat tissular (llavor)	RYREPEATLEGUMINBOX	CATGCAY		1
	Especificitat tissular (llavor)	S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA		2
	Especificitat tissular (llavor)	SEF1MOTIF	ATATTTAWW		7
	Especificitat tissular (llavor)	SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTTR		9
Pol·len	Expressió específica a pol·len	POLLEN1LELAT52	AGAAA		13
Cicle cel·lular					

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat (PlantCare)*	Quantitat (PLACE)
	Activador de la transcripció activat per citoquinines	ARR1AT	NGATT		22
	Relacionat amb el cicle cel·lular	E2FCONSENSUS	WTTSSCSS		2
	Cicle cel·lular	MYBCOREATCYCB1	AACGG		1
<hr/>					
Altres					
	Lloc d'unió de la proteïna d'unió a llocs rics en ATs (ATBP-1)	AT-rich element	ATAGAAATCAA	1	
	Associat al motiu TGAGTCA	ATGCAAAT motif	ATACAAAT	2	
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	69	42
	Regulació del metabolisme de la zeïna	O2-site	GTTGACGTGA	1	1
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATABOX2	TATAAAT	6	6
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATABOX3	ATTAAT		3
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATABOX4	TATATAA	2	5
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATABOX5	TTATTT		10
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATAPVTRNALEU	TTTATATA		2
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATABOXOSPAL	TATTTAA		5
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	4	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	3	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	13	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	8	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	CACTATATAAAG	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	ccTATAAATT	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	34	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	42	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	12	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	5	
	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	TTTTA	36	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATT	2	
	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	taTATAAAtc	1	

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat (PlantCare)*	Quantitat (PLACE)
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATATA	1	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATGT	2	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	3	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tcTATATAtt	1	
	Promotor base a -30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAAA	2	
	Promotor d'alts nivells de transcripció	5UTR Py-rich stretch	TTTCTTCTCT	1	
	Promotor de psbD (en cloroplasts)	-10PEHVPSBD	TATTCT		1
	Caixa de l'amilasa	AMYBOX2	TATCCAT	3	3
	Lloc d'unió de transcriptors C-repeat	CBFHV	RYCGAC		1
	Resposta a l'oxigen (en <i>Chlamidomonas reinhardtii</i>)	CURECORECR	GTAC		12
	Lloc d'unió a proteïnes Dof (a <i>Zea mais</i>)	DOFCOREZM	AAAG		29
	Caixa de proteïna de reserva nap-1	EBOXBNNAPA	CANNTG		8
	Resposta a CO ₂	ECCRCAH1	GANTTNC		2
	Regulador de proteases (altres)	LECPLEACS2	TAAAATAT		2
	Trobat en resposta a carència de fosfat	P1BS	GNATATNC		4
	Poliadenilació en plantes? Germinació?	POLASIG1	AATAAA		14
	Poliadenilació en plantes? Germinació?	POLASIG2	AATTAAA		10
	Poliadenilació en plantes? Germinació?	POLASIG3	AATAAT		8
	Lloc d'unió a factors de transcripció bZIP	PREATPRODH	ACTCAT		1
	Pyrimidine box (repressió de sucre)	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT		1
	Regulació de fitocroms	REALPHALGLHCB21	AACCAA		1
	Regulació de fitocroms	REBETALGLHCB21	CGGATA		1
	Regulador del sucre/tubercle	SURE2STPAT21	AATACTAAT		1
	Resposta al sulfur	SURECOREATSULTR11	GAGAC		1
	Millora dels nivells d'expressió en dicotiledònies	TRANSINITDICOTS	AMNAUGGC		1
	Millora dels nivells d'expressió en monocotiledònies	TRANSINITMONOCOTS	RMNAUGGC		1
	Lloc d'unió de WRKY. WB Box	WBBOXPCWRKY1	TTTGACY		4
	Lloc d'unió de WRKY. WB Box	WBOXATNPR1	TTGAC		10
	Lloc d'unió de WRKY. WB Box	WBOXHVIS01	TGACT		6
	Lloc d'unió de WRKY. WB Box(ferida?)	WBOXNTERF3	TGACY		8
	Lloc d'unió de WRKY. WB Box (patogènesi?)	WRKY71OS	TGAC		17
	Lloc d'unió de WUS	WUSATAg	TTAATGG		1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat (PlantCare)*	Quantitat (PLACE)
	Regulador del sucre (repressió)	TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY		3
Desconeguda					
		AAGAA-motif	GGTAAGAA	1	
		AC-II	TCAACCAACTCC	1	
		TCCACCT-motif	TCCACCT	1	
		Unnamed 4	CTCC	5	
		Unnamed 8	TCCACGTAGA	1	
		box S	AGCCACC	1	
		-300ELEMENT	TGTAAAG		4
		ACGTATERD1	ACGT		4
		CAREOSREP1	CAACTC		3
		CCAATBOX1	CCAAT		2
		CPBCSPOR	TATTAG		2
		GTGANTG10	GTGA		15
		MARARS	WTTTATRITTTW		1
		MARTBOX	TTWTWTTWTT		2
		OSE1ROOTNODULE	AAAGAT		2
		OSE2ROOTNODULE	CTCTT		10
		RBCSCONSENSUS	AATCAA		1
		ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT		46
		SITEIIATCYTC	TGGGCY		1
		SREATMSD	TTATCC		4
		UP1ATMSD	GGCCCAWWW		1

Taula 3 Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StNAC103* (-2276b). *El PlantCare només permet seqüències de 1500b. La seqüència de 2291b a 5' clonada en aquest treball es va sotmetre en dues fraccions en aquest programa. Es va parar esment que no es seccionés cap element regulador.

Estructura del gen

La longitud de la seqüència codificant d'*StNAC103* és de 1005 parells de bases que codifiquen per una proteïna potencial de 334 aminoàcids, amb un pes molecular teòric de 37,617 kDa i un punt isoelèctric de 6,33.

S'ha confirmat la presència d'un domini NAM/NAC a *StNAC103* a través d' InterProScan, segons la base de dades PFAM i ProDom -NAM (IPR003441)-, i PROSITE i SCOP -NAC-. Mitjançant el servei ExPasy Prosite, s'ha deduït la seqüència d'aminoàcids d'*StNAC103* i s'ha comprovat la presència dels subdominis NAC, A-E (segons van ser descrits per Kikuchi *et al* (2000)) (Figura 6).

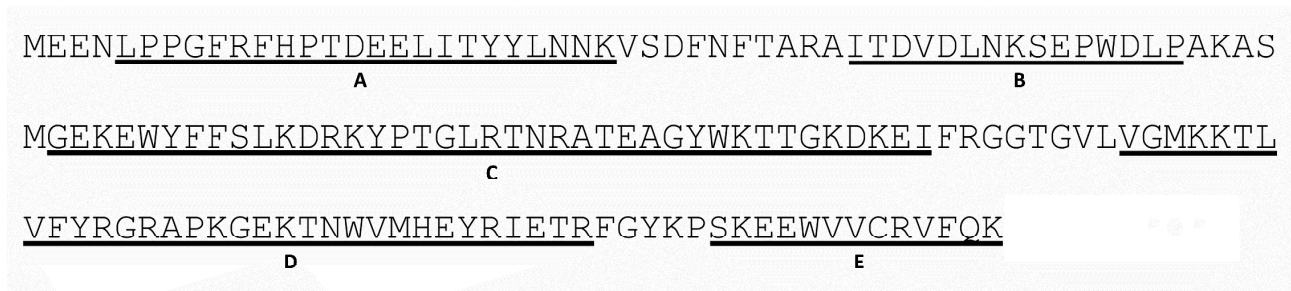


Figura 6 Seqüència proteica del domini NAC d'*StNAC103* amb els subdominis A-E indicats.

El programa FUGUE, que associa seqüència a estructura i fa les comparacions a aquest nivell, proposa com a única seqüència recomanada, l'estructura d'ANAC019 (hs1ut7a). No s'ha trobat dominis transmembrana en la seqüència aminoacídica amb cap de les eines bioinformàtiques assajades (HMMTOP, InterProScan, NetPhosk i DAS-TMfilter).

Els dos introns trobats a la seqüència de l'ortòleg a *S. tuberosum* grup Phureja estan situats, el primer just al final del fragment que codifica per al subdomini B (bases 155-1118) i el segon, separa els dos primers codons que codifiquen per al subdomini E de la resta del subdomini (SK-intró-EEWVVCRVFQK) (bases 1391-2040). La distribució característica de dos introns i tres exons dels gens NAC de la subfamília NAM/CUC

d'Arabidopsis i pollancre (Jensen *et al* 2009, Hu *et al* 2010) va ser descrita per Souer *et al* (1996). La subfamília II-3 d'Arabidopsis (NAM/CUC) correspon a la Nac-c de patatera en l'estudi de Singh *et al* (2013). En el cas d'*StNAC103*, s'ha vist que el tercer exó encara codifica per una part del domini NAC conservat.

Seqüència proteica i anàlisi de motius

Les estructures secundàries predites per a *StNAC103* varien depenent del software utilitzat. S'ha adoptat com a més probable la predicció generada pel programa Phyre ja que té en compte l'estructura resolta més similar (Figura 7, B), la d'ANAC019, resolta per cristal·lografia de raigs X per Ernst *et al* (2004). La predicció de Phyre es pot contrastar amb la de l'eina CFSSP, que prediu l'estructura secundària *ab initio* i per tant, està subjecte a una major probabilitat d'error. Amb l'eina CFSSP, al llarg de la seqüència es preveuen diverses regions on hi ha una ambigüitat respecte si estan plegades en forma de full β o hèlix α . No obstant, hi ha prediccions clares per al full β , posicions 9-28; 71-88; 233-245, i per a l'hèlix α , posicions 217-231. Les prediccions de CFSSP contrasten amb la imatge de l'estructura resolta d'ANAC019 i les prediccions dels programes utilitzats per generar un model tridimensional -més avall-, on els residus configurats en hèlix α s'acumulen al principi del domini conservat, fins a la posició 62, mentre que la zona on domina el full β es troba majoritàriament entre els residus 60 fins al 161.

Per tal de predir si es formen estructures d'hèlix enroscada, és a dir, hèlixs α enroscades sobre sí mateixes com es dona amb les vetes d'una corda, s'ha utilitzat els programes COILS/PCOILS i MARCOIL. No és probable que es generi aquest tipus d'estructura terciària ja que només COILS assigna una probabilitat a la formació d'hèlix enroscada, $p=0,1$ a les posicions 209-233. En comparació, la seqüència de QsNAM té una $p=0,1$ que es formi una hèlix enroscada a les posicions 192-205 i $p=0,02$ als residus 150-162, que tampoc suposen la formació d'hèlix enroscada. La formació d'hèlix enroscada tampoc s'aprecia en els resultats obtinguts en la generació d'un model tridimensional d'*StNAC103*, que no prediu cap estructura secundària definida (POODLE).

S'ha dut a terme una modelització tridimensional mitjançant les eines ESyPred3D -a partir d'un motlle-, I-TASSER -*ab initio*- i Phyre2 -model mixt-. Per a l'ús d'ESyPred3D, s'ha comparat *StNAC103* amb l'estructura resolta més similar 1UT7 (Ernst *et al* 2004). Les comparacions dutes a terme han estat a partir d'un sol monòmer d'*StNAC103*. El 43 % de la seqüència -que correspon al domini NAC- s'ha pogut resoldre amb més d'un 90 % de confiança en l'estructura tridimensional a través del Phyre2. No obstant, més de la meitat de la seqüència es prediu sense estructura secundària (Figura 7, B).

Figura 7 Predicció de l'estructura terciària i secundària d'StNAC103 A) Imatge estereoscòpica de l'estructura 3D de la cadena de carbonis de la proteïna StNAC103, resolta a través del programa Phyre2. La coloració equival a la puntuació a les distàncies *root-mean-square* entre la cadena predita i 1UT7. El blau correspon a una major proximitat de cadena entre l'estructura predita i 1UT7 i el vermell a la menor. B) Predicció d'estructures secundàries i desordre en la seqüència StNAC103, segons Phyre2.

El programa I-TASSER ha generat 5 models diferents per a StNAC103. En tots ells hi ha una gran similitud del domini NAC conservat. La resta de la cadena, que correspon a la zona específica o TAR, majorment no té una estructura tridimensional definida. L'I-TASSER ha permès també identificar com a estructura més similar i gairebé del tot coincident de les bases de dades, l'estructura 1UT7A, que correspon a ANAC019 (TM=0,403, que indica la similitud mitjançant el mètode *root-median-square*, esbiaixat per evitar l'error local). A més, també escull l'estructura 1UT7 com a estructura més probable d'unió al model generat sobre StNAC103 (C-score=0,25, indica la fiabilitat del model generat per al mateix programa en un rang [-5,2]). A la Figura 7 (A) es presenten els models d'StNAC103 generats més similars a 1Ut7A, amb els programes Phyre i I-TASSER. Els colors que es mostren corresponen a la similitud respecte el model 1Ut7A en l'escala cromàtica, de blau marí (més similitud) a vermell.

Per tal de determinar si la proteïna StNAC103 podia tenir un temps de vida mitja curt, s'ha buscat si conté una seqüència PEST, la qual indicaria un baix temps de vida mig però no se n'ha trobat cap. Aquest resultat descarta la proteòlisi per PEST d'StNAC103.

Pel que fa a la predicció de localització subcel·lular de la proteïna, val la pena esmentar que s'ha predit localització a nucli amb Wolfpsort, ESLPred i TargetP. A més a més, en l'estudi de la família NAC de patata Singh *et al* (2013) localitzen un NLS dins el subdomini D de la proteïna de tots els gens de la família excepte StNAC054 i StNAC075. Cal remarcar que mitjançant l'eina NetNES1.1 (la Cour *et al* 2004) s'ha trobat una senyal d'exportació nuclear (NES, residus 255 a 262), la qual cosa reforça la localització nuclear de la proteïna. Per altra banda les senyals NES apunten que l'activitat de la proteïna es pot regular a través de la localització a nucli. Però el més concloent s'ha obtingut amb resultats recents que han demostrat experimentalment la capacitat de la proteïna StNAC103 per dirigir-se a nucli quan es transforma de forma transitòria *Nicotiana benthamiana* amb la fusió de la proteïna StNAC103 a GFP (Garrote Gironès 2013). Finalment, en referència a la localització, no hi ha indicis que StNAC103 funcioni com a proteïna de membrana i que posteriorment sigui importat a nucli, degut a la manca de localitzacions de palmitoilació i prenilació (eines de predicció GPS, CUCKOO workgroup, taula 4). Tampoc es troben pèptids senyals de localització a mitocondris ni cloroplasts (iPSORT).

A nivell de modificacions post-traduccionals, mitjançant les eines de predicció GPS (CUCKOO workgroup), s'ha cercat els tipus de modificacions i possibles localitzacions, tal com s'indica a la taula 4. Una predicció *in silico* de motius funcionals ELMFSP (*Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins*), ha revelat diversos possibles llocs de modificació post traduccional. Es va indicar com a paràmetre la localització d'StNAC103 a nucli. Es localitzen diverses seqüències dianes de fosforil·lació per a diferents cinases: MOD_CK1_1 (*Casein kinase I*) [166-172; 169-175; 247-253; 251-257; 273-279; 274-280]; MOD_CK2_1 (*Casein kinase II*) [11-17; 52-58; 138-144; 263-269]; MOD_GSK3_1 (*Glycogen synthase kinase 3*) [70-77; 74-81; 162-169; 169-176; 194-201; 195-202; 196-203; 239-246; 243-250; 244-251; 247-254; 269-276; 270-277; 271-278], MOD_ProDKin_1 (*Proline-directed kinases*) [163-169; 169-175; 196-202; 263-269], MOD_PLK (*Polo-like kinase*) [313-319] MOD_PKA_2 (*cAMP-dependent protein kinase A*) [78-84], MOD_PIKK_1 (*DNA-PK (DNA-dependent protein kinase)*), ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), and ATR (*ATM and Rad3 related*)) [290-296]). També s'ha trobat dianes de glicosilació: MOD_N-GLC_1 [30-35; 42-47; 176-181; 205-210; 247-252] i sumoilació: MOD_SUMO [118-121]. La manca de localitzacions de palmitoilació i prenilació confirma que StNAC103 no funciona com a proteïna de membrana.

Pel que fa a la predicció de possibles dominis d'interacció amb proteïnes, s'ha predit interaccions amb diferents proteïnes i en conseqüència, diferents implicacions a nivell fisiològic:

- LIG_14-3-3 3 (*14-3-3 proteins*) [228-233] que forma homo o heterodímers i estan involucrades en diversos processos de regulació cel·lular i funcionen com a adaptadors per mitjançar interaccions entre proteïnes
- LIG_CYCLIN [108-112; 258-262] d'interacció amb la ciclina o inhibidors de ciclina, sempre que hi aparegui un lloc MOD_CDK, però no és el cas
- LIG_FHA_1 (*forkhead-associated domain*) [18-24 ; 98-104; 121-127; 232-238]
- LIG_FHA_2 [12-18; 36-42; 87-93; 275-281] d'unió a dominis FHA, abundants en proteïnes nuclears i sobretot involucrats en processos relacionats amb el cicle cel·lular, mecanismes de reparació de DNA i regulació transcripcional
- LIG_PP1 (*Protein phosphatase-1*) [106-113] d'unió a la subunitat de la fosfatasa 1, que es sol trobar sempre en polipèptids desordenats en forma nativa

- **LIG_SCF_FBW7_1** (*Skp1-Cullin-F box*) [196-203] relacionat amb el cicle cel·lular i la unió a FBW7 (*E box proteins* que s'uneixen via una *WD40 beta propeller*)
- **LIG_USP7_1** (*ubiquitin-specific protease 7*) [52-56, 162-166; 239-243; 271-275; 300-304; 307-311], domini de lligament a l'enzim desubiquitinador USP7
- **LIG_WW_Pin1_4** [163-168; 169-174; 196-201; 263-268], amb el domini WW d'interacció amb la prolil isomerasa depenent de fosforilació Pin1 (*Protein interacting with NIMA 1*), que es troba en situacions de regulació de la proliferació i supervivència cel·lular

Llindar de selecció

Modificació	Alt	Mitjà	Baix	Tots els possibles
Palmitoilació	-	-	-	148,174
Sumoilació	119*	158	70,142,328	26,44,53,59,67,8 7,91,93,107,108, 122,139,153,159
S-nitrosilació	-	-	-	148,174
Nitració de tirosines	22,327	265	71	21,62,85,113,130 ,138,178,198,212 ,281
Llocs de tall de calpanines	4,41,158-160,163- 165,169,171,228- 233,250,253,270,272- 279,310,314,319,327	3,51,96,104,157, 161,205,220,224, 226,227,235,263, 271,283,305,312, 315,318,330	34,43,76,79,1 13,156,162,1 97,204,222,2 34,249,254,2 57,316,326	Totes
Fosforilació	316*	208	155,310	
Fosfo-unió	166*,199	274,275	156,166,172* ,272,276	
Pupilació	328	-	159	26,44,53,59,67,7 0,87,91,93,107,1 08,119,122,139,1 42,153,158
Caixes D i KEN	-	-	-	-

Taula 4 Possibles localitzacions de modificació post-transcripcional dins la proteïna StNAC103 identificades mitjançant les eines de predicció GPS (CUCKOO workgroup). S'indica les posicions del residu afectat per la possible modificació. El nivell alt de llindar de selecció és el més restrictiu. Als llindars menys restrictius només s'indica els residus que no eren presents als llindars més restrictius per evitar-ne la repetició total. Marcats amb un asterisc (*) les posicions que coincideixen amb l'eina ELM-FSP.

Homologia i filogènia

A través de blastp en diverses bases de dades, s'ha recuperat les seqüències dels possibles ortòlegs d'StNAC103 en surera, tomàquet, pollancre, vinya i Arabidopsis. S'ha escollit com a possible ortòleg la seqüència més similar, és dir, la que presentava un valor E inferior, i per tant, un grau d'identitat superior en una longitud total de la seqüència el més gran possible.

S'ha construït un filograma (Figura 8) per mitjà de quatre tipus de seqüències a més de la d'StNAC103. En primer lloc s'ha utilitzat el conjunt de seqüències de NACs d'Arabidopsis més properes a l'ortòleg d'StNAC103 (ANAC058) i que corresponen al grup II-3 del treball de Jensen *et al* (2009). Aquest grup de seqüències s'ha inclòs per permetre comparar la proximitat de la resta de seqüències analitzades respecte StNAC103, ANAC058 i els seus paràlegs. En segon lloc s'ha inclòs en el filograma els ortòlegs d'StNAC103 en altres espècies properes i amb genomes coneguts, per tal de comprovar el seu grau d'homologia. També s'ha utilitzat les seqüències proteiques de patatera que podien ser dianes de la seqüència d'RNAi del silenciament conservat -veure capítol 2.2, Material biològic-. Es considerava la possibilitat del silenciament quan hi havia 0 malaparellaments en un fragment d'una llargada mínima de 20 nucleòtids entre la seqüència nucleotídica del cDNA del gen respecte el fragment d'RNAi. Finalment, s'ha inclòs un seguit de seqüències amb homologia més baixa per tal de donar arrel al filograma. Aquestes pertanyen a les subfamílies NAC-f definit per Singh *et al* (2013), i III-2 i III-3 definits per Jensen *et al* (2009). Es tracta concretament, d' StNAC (StNAC053) i ATAF1, ANAC072, ANAC029, així com GRAB1 de *Triticum aestivum* (ortòleg d'ANAC102).

En el filograma que en resulta es pot apreciar la gran proximitat de tots els possibles ortòlegs d'StNAC103, que s'agrupen en una sola branca, dins el que correspon al grup II-3 (de la família NAC en Arabidopsis (ANAC), segons Jensen *et al* (2009)) o NAC-c (en patata, segons Singh *et al* (2013)). El més similar a StNAC103 és l'ortòleg de tomaquera SINAC i tot seguit, el grup de QsNAC, PNAC105 i els VvNAC06. QsNAC, PNAC105 i VvNAC06 presenten una major similitud entre sí que amb StNAC103 i SINAC. En canvi, donats els valors de *bootstrap*, ANAC058 i PhNAC no es poden assignar al subclade d'ortòlegs d'StNAC103 que s'observa i tampoc els podem distingir de la resta de membres del grup II-3, com passa per exemple amb GRAB2 de *T aestivum*.

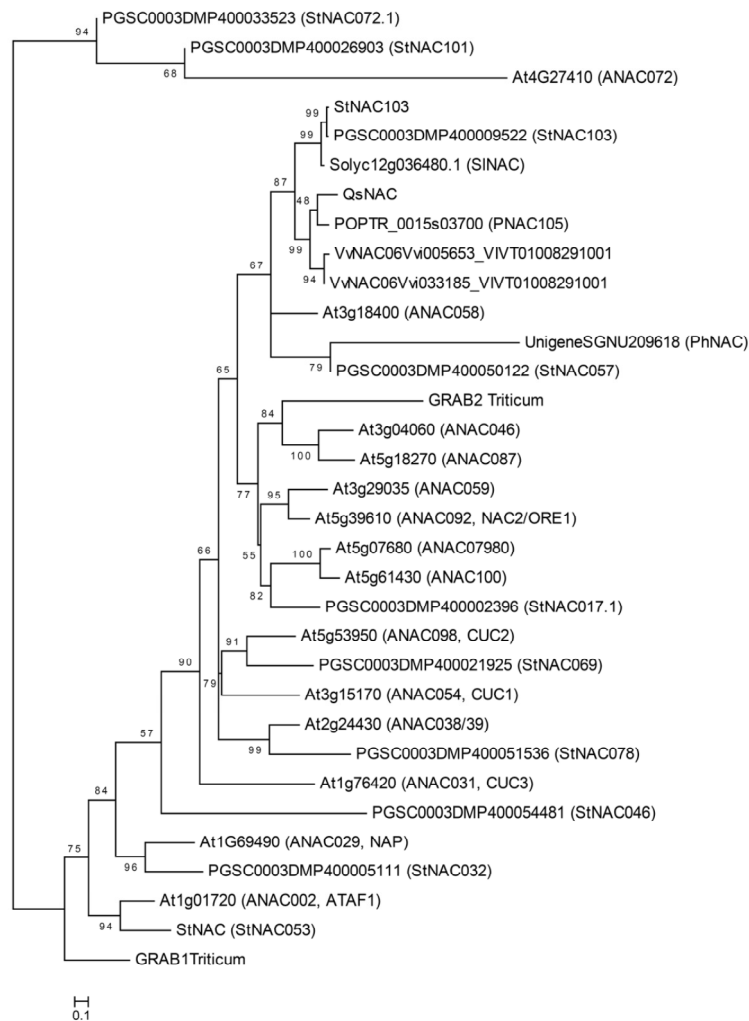


Figura 8 Filograma d'StNAC103 i els seus possibles ortòlegs, els membres del grup II-3 de NACs d'Arabidopsis, alguns membres del grup III-2 (ANAC029) i III-3 (ANAC002, ANAC072), i proteïnes els cDNAs de les quals mostren 0 malaparellaments en la seqüència nucleotídica de l'RNAi del silenciament conservat -capítol 3-. Els valors de *bootstrap* estan indicats a cada node.

La meitat de les seqüències amb 0 malaparellaments respecte l'RNAi del silenciament conservat es troben situades dins el grup format per les seqüències pertanyents al grup II-3/NAC-c com ANAC58 i StNAC103 respectivament (StNAC057, StNAC017.1, StNAC078 i StNAC069). No obstant, l'altra meitat (StNAC046, StNAC032, StNAC072.1 i StNAC101) es troben diferenciades de les del grup II-3. Aquest resultat concorda amb el treball de Singh *et al* (2013), que els assigna un grup NAC-f, excepte a StNAC046, que pertany al

grup NAC-i. Els gens d'ATAF1, StNAC (StNAC053), StNAC072, StNAC101, ANAC072, i ANAC029 (NAP) pertanyen al grup NAC-f de patata (o III-3 i III-2 a *Arabidopsis* (Jensen *et al* 2009)). Dins aquest grup trobem NACs amb les funcions relacionades amb el desenvolupament, la mort cel·lular programada per estrès i la senescència, com es pot trobar discutit més avall.

Comparació d'StNAC103 amb les proteïnes més homòlogues de Solanàcies, Vitis i Pollancre

S'ha dut a terme una cerca mitjançant el programa MEME per tal de trobar motius generalment conservats en les seqüències dels gens NAC de patatera (Singh *et al* 2013) que pugui compartir *StNAC103*. Per a l'anàlisi s'ha utilitzat les seqüències de patatera i *Arabidopsis* també emprades per a la construcció del filograma (Figura 8), que són les més properes a *StNAC103*. També s'ha estipulat un criteri de retorn de 50 motius per al programa. Amb aquesta estratègia s'ha volgut assegurar que es trobaven tots els motius possibles per al conjunt de seqüències emprat. Un bon indicador d'això ha estat que el MEME ha identificat dins el mateix motiu (ja reconegut en la bibliografia) diversos submotius. Per tal d'assegurar que els motius trobats són motius reals i no un artefacte, es va utilitzar els motius donats pel MEME en el programa MAST per tal que el rastregés sobre totes les seqüències representades a la Figura 8. A la Figura 9 (B) es mostren solament els motius identificats pel MAST, amb els criteris de probabilitat que dona el programa per defecte -en tots els casos es dona una $p < 0,0001$ -. A més, els motius amb un coeficient de correlació amb un altre motiu superior a 0,6 -susceptibles de ser iguals a un altre-, s'han descartat. S'ha constatat per comparació, les seqüències dels motius que el programa retorna amb la bibliografia, i alguns d'ells es corresponen amb els identificats per Jensen *et al* (2009). Així, el 3 equival a l'A -i el principi de l'F conjuntament-, l'11 al B, l'1 al C, el 2 al D i el 8 a l'E. Quan ha estat possible, mitjançant la bibliografia, identificar o agrupar els motius que s'ha trobat, s'ha fet així. En cas contrari, es presenta per separat els motius, encara que aquests siguin adjacents. Pel que fa a *StNAC103*, els motius que s'ha identificat en la seva seqüència es troben localitzats tal com està indicat a la Figura 10.

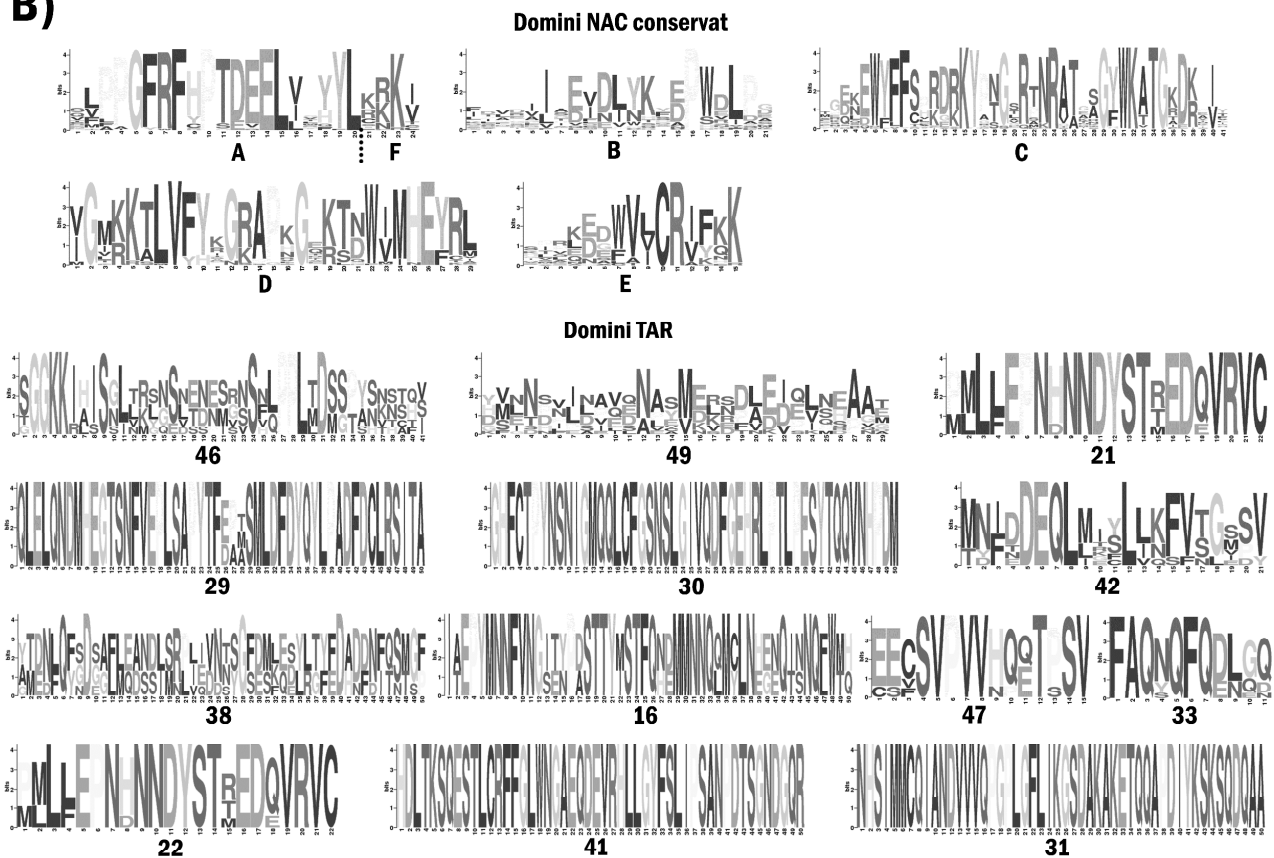
<i>S. tuberosum</i>			<i>S. lycopersicum</i>			<i>N. benthamiana</i>		
Identificador	Identificador (Singh 2013)	Valor E	Identificador	Descriptor	Valor E	Identificador	Descriptor	Valor E
PGSC0003DMP400009522	StNAC103	1e-168	Solyc12g036480.1.1	NAC domain protein IPR003441 protein	1e-156	NbS00043958g0005.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 1e-126
PGSC0003DMP400050122	StNAC057	6e-99	Solyc06g069100.1.1	NAC domain protein IPR003441 protein	3e-87	NbS00018780g0005.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 1e-119
PGSC0003DMP400026135	StNAC076	4e-71	Solyc07g062840.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	1e-71	NbS00012470g0003.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 1e-118
PGSC0003DMP400051536	StNAC078	9e-70	Solyc08g006020.2.1	NAC domain transcription factor protein	9e-71	NbS00036444g0001.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 2e-74
PGSC0003DMP400055801	StNAC058.3	1e-67	Solyc08g074300.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	1e-68	NbS00016896g0010.1	NAC domain transcription factor [Solanum lycopersicum]	4e-73
PGSC0003DMP400033929	StNAC030.2	1e-65	Solyc06g069710.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	1e-68	NbS00022512g0011.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 8e-71
PGSC0003DMP400002396	StNAC017.1	5e-63	Solyc03g115850.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	4e-66	NbS00014197g0005.1	NAC No Apical Meristem domain transcriptional regulator [Arabidopsis thaliana]	8e-70
PGSC0003DMP400017509	StNAC044	1e-62	Solyc02g088180.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	1e-63	NbS00046695g0007.1	NAC domain transcription factor [Solanum lycopersicum]	2e-69
PGSC0003DMP400055799	StNAC058.1	1e-59	Solyc07g066330.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	3e-52	NbS00016883g0004.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 2e-65
PGSC0003DMP400033928	StNAC030.1	3e-58	Solyc06g065410.2.1	NAC domain protein IPR003441 protein	7e-52	NbS00029919g0005.1	NAC domain protein [Solanum lycopersicum]	IPR003441 6e-65

Taula 5 Homòlegs d'StNAC103 a *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* i *N. benthamiana*. Blastp de la seqüència d'StNAC103 en la base de dades de Potato Genome Sequencing Consortium, amb els paràmetres per defecte.

A)

Identificador en patatera		MEME	Possible ortòleg en Arabidopsis		Motius a Arabidopsis*	MAST**	
						Patatera	Arabidopsis
StNAC072	PGSC0003DMP400035323	3,1,1,1,2,8				3,1,2,8	
StNAC101	PGSC0003DMP400026903	3,1,1,1,2,8,46	ANAC072	At4g27410	A,B,C,D,E,,h,o,m,t,u	3,1,2,8,46	8,21
StNAC103	PGSC0003DMP400009522	3,1,1,1,2,8,49	ANAC058	At3g18400	A,B,C,D,E,FV,Q,T,M	3,1,2,8,49	3,1,2,8,16
StNAC057	PGSC0003DMP400050122	3,1,1,1,2,8,29				3,1,2,8,29	
			ANAC046	At3g04060	A,B,C,D,E,FLP		3,1,2,8,46
			ANAC087	At5g18270	A,B,C,D,E,FLP		3,1,2,8,41,16
			ANAC059	At3g29035	A,B,C,D,E,LP,V,W		3,1,2,8
			ANAC092	At5g39610	A,B,C,D,E,LP,V,W		3,1,2,8
			ANAC079	At5g07680	A,B,C,D,E,FLP,V,W		3,1,2,8,46,47
StNAC017	PGSC0003DMP400002396	3,1,1,1,2,8,38	ANAC100	At5g61430	A,B,C,D,E,FLP,V,W	3,1,2,8,46,38	3,1,2,8,46,30
StNAC069	PGSC0003DMP400021925	1,2,8,30	ANAC098	At5g53950	A,B,C,D,E,LP,V,W	1,2,8,30	3,1,2,8,46
			ANAC054	At3g15170	A,B,C,D,E,FLP,V,W,M,a		3,1,2,8,33
StNAC078	PGSC0003DMP400051536	3,1,1,1,2,8,16	ANAC038	At2g24430	A,B,C,D,E,LP	3,1,2,8,16	3,1,2,8,42
StNAC046	PGSC0003DMP400054481	3,1,1,1,2,8	ANAC031	At1g76420	A,B,C,D,E,LP,WQ,Q,U	3,1,2,8,33	3,1,2,8
StNAC032	PGSC0003DMP400005111	3,1,1,1,2,8,31	ANAC029	At2g69490		3,1,2,8,31	3,1,2,8,22
StNAC053	PGSC0003DMP400030689	3,1,1,1,2,8	ANAC002	At1g01720	A,B,C,D,E,F,G,n,g,o		3,1,2,8,47

B)



C)

Proteïna StNAC	Identificador en patata	Ortòleg Arabidopsis	Identificador en Arabidopsis	Valor de p
StNAC103	PGSC0003DMP400009522	ANAC058	At3g18400	2,35 E ⁻⁵
StNAC068	PGSC0003DMP400060971	ANAC068	At4g01540	2,03 E ⁻⁵
StNAC049	PGSC0003DMP400040416	ANAC050	At3g10480	9,76 E ⁻¹³
StNAC001	PGSC0003DMP400000341	ANAC101 (VND6)	At5g62380	6,08 E ⁻¹⁴
StNAC095	PGSC0003DMP400054120	ANAC050	At3g10480	8,62 E ⁻¹⁴
StNAC058.2	PGSC0003DMP400055800	ANAC100 (ATNAC5)	At5g61430	1,67 E ⁻¹⁸
StNAC058.3	PGSC0003DMP400055801	ANAC100 (ATNAC5)	At5g61430	1,67 E ⁻¹⁸
StNAC035	PGSC0003DMP400058145	ANAC086	At5g17260	2,34 E ⁻²¹
StNAC056	PGSC0003DMP400062271	ANAC055	At3g15500	2,47 E ⁻²³
StNAC094.1	PGSC0003DMP400049938	ANAC103	At5g64060	1,61 E ⁻²⁴
StNAC094.2	PGSC0003DMP400049939	ANAC103	At5g64060	1,61 E ⁻²⁴
StNAC094.3	PGSC0003DMP400049940	ANAC103	At5g64060	1,61 E ⁻²⁴
StNAC023.1	PGSC0003DMP400001112	ANAC091 (TIP)	At5g24590	6,54 E ⁻²⁴
StNAC023.2	PGSC0003DMP400001113	ANAC091 (TIP)	At5g24590	6,54 E ⁻²⁴
StNAC023.3	PGSC0003DMP400001114	ANAC091 (TIP)	At5g24590	2,34 E ⁻²⁴ i 7,62 E ⁻⁵

Figura 9 Comparativa de motius conservats entre diversos gens NAC. A) Motius conservats identificats a partir de les seqüències usades en el filograma (Figura 8). Es mostra els motius sobre les seqüències de NACs de patatera del filograma. *Motius esmentats per Jensen *et al* (2009). **Motius trobats pel programa MAST sobre totes les seqüències del filograma a través de l'arxiu de motius generat pel MEME. Es corresponen els motius trobats pel MEME amb els identificats per Jensen *et al* (2009), el 3 amb l'A (i l'inici de l'F), l'11 amb el B, l'1 amb el C, el 2 amb el D i el 8 amb l'E. B) Logotips dels motius identificats. C) Llistat de NACs de patatera que comparteixen el motiu 49 amb StNAC103 i els seus ortòlegs d'Arabidopsis.

Figura 10 Identificació i localització de motius conservats en la seqüència d'StNAC103. Es mostra la seqüència proteica amb la localització que ocupa cada motiu subratllada i amb el número de motiu que correspon a sota. Entre parèntesi, la nomenclatura acceptada en la bibliografia per a motius identificats prèviament. El domini conservat NAC es mostra en negreta.

```

STNAC103 MEENLPPGFRFHPTDEELITYYLNKVSDFNFTARAITDVDLNKSEPWDLPAKASMGEKEWYFFSLKDRK 70
          3 (A)                                11 (B)                                1 (C)

YPTGLRTRNATEAGYWKTGKDKEIFRGGTGVLVGMKKTLVFYRGRAPKGEKTNWVMHEYRIETRFQYKP 140
          1 (C)                                2 (D)

SKEEWVVCRVFQKSSTVKKPQPTSSSPLSLESPCDNTNYTIANELGDIELPFNFNYLTTTPSSTINNISLH 210
          8 (E)

NYYNDNINLAAAAAATREAAAANTHPLLPWSSNLVSSNLSSVNSLLFRALQLRGYSPREQATSSTTTTHD 280
          49

YAFMLPQENILTTQFGNDFAVNSIGAPSSSMALDNSVQHQQPQEQLYKLDSDIL 338
    
```

També s'ha pogut apreciar (Figura 9, A) que StNAC103 conté un motiu que anomenarem 49, que no comparteix amb cap altre dels membres del seu subgrup filogenètic de patatera (NAC-c, també anomenat XI, a partir de la comparació de motius, segons el treball de Singh *et al* (2013)) tret d'StNAC058 -ANAC100-. La resta de NACs de patatera que comparteixen el motiu 49 es troben en altres grups filogenètics diferents de l'XI i s'han llistat a la Figura 9 (C).

En referència als possibles ortòlegs d'StNAC103 en altres espècies, es pot apreciar que els motius continguts varien entre organismes. Així, comparteixen el motiu 49 (Figura 9) només amb el de pollancre (PNAC105). A més, s'ha observat que ANAC058 conté un motiu 16 (Figura 9), així com QsNAC, SINAC i VvNAC06 (033185).

Per tal de trobar motius específics del grup NAC-c de patatera (Singh *et al* 2013), en el domini TAR s'ha realitzat una segona cerca de motius per mitjà de MEME, solament dins aquest grup NAC-c, més els ortòlegs d'StNAC103. Tot seguit els motius identificats amb MEME s'han cercat en les seqüències de tots els NAC de patatera a través de MAST (Figura 9). La compartició de motius en el domini TAR podria significar també la compartició de dianes per a l'ancoratge de proteïnes reguladores o acompanyants i/o modificacions post- traduccional.

S'ha observat que SINAC comparteix amb StNAC103 tots i cadascun dels motius identificats. Tot seguit els més similars són PNAC105 i VvNAC06. Amb QsNAC comparteix els motius 7', 10' i 6'. Dins dels gens NAC de patatera, són remarcables les similituds entre StNAC103 i StNAC057 amb el qual comparteix els motius 7', 20', 6', 13' i 18', i amb StNAC047, que comparteix els motius 20', 13' i 8'. És remarcable que el motiu 20' només s'ha trobat en solanàcies.

A)

Factor de transcripció NAC	Motiu						
	7'	20'	10'	6'	13'	8'	
StNAC103	1	1	1	1	1	1	
StNAC057	1	1		1		1	
StNAC047		1			1	1	
SINAC	1	1	1	1	1	1	
QsNAC	1		1	1			
PNAC105	1		1	1	1	1	
VvNAC06	1		1	1	1	1	
GRAB2			2				
ANAC058	1			1		1	
<i>Factors de transcripció NAC amb un sol motiu en comú amb StNAC103:</i>	StNAC030.2, StNAC058.2, StNAC058.3, StNAC077.1, StNAC077.2, StNAC098	StNAC053	StNAC018.1, StNAC031, StNAC073, StNAC086.2, StNAC092, StNAC094.1, StNAC094.2, StNAC094.3	StNAC048, StNAC027, StNAC011		StNAC004, StNAC088, StNAC110	

B)

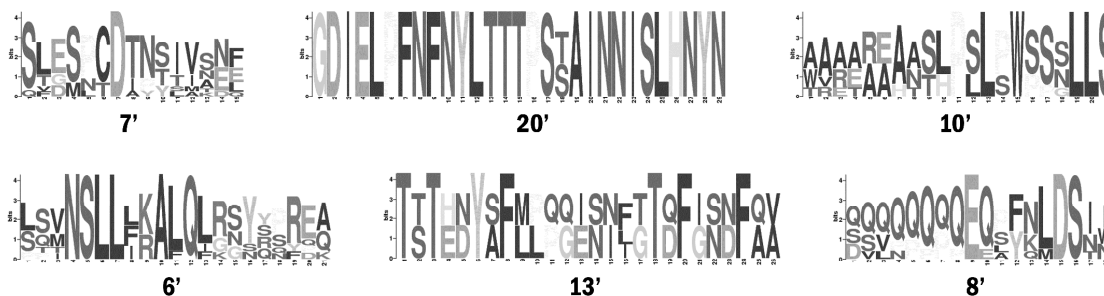


Figura 11 Motius específics del grup NAC-c de factors de transcripció NAC de patatera que conté StNAC103. Motius identificats mitjançant el programa MEME. A) Factors de transcripció NAC del filograma (Figura 8) i del conjunt de factors NAC de patatera que comparteixen amb StNAC103 un o més motius específics del grup NAC-c de factors de transcripció NAC de patatera. B) Logotip dels motius específics del grup NAC-c, presents a StNAC103. S'anomenen amb un nombre i un apòstrof per distingir-los dels mostrats a la Figura 9.

La comparació de motius conjuntament amb un blastp realitzat a través del programa BioEdit ajuda a formar-se una idea de la similitud entre les seqüències esmentades. Així, StNAC103 té una similitud del 89 % respecte SINAC, un 77 % amb QsNAC, un 62-63 % amb VvNAC06, un 63 % amb PNAC 105, un 68 % amb StNAC057 i un 55 % amb ANAC058.

En comparació amb StNAC103, StNAC057 acumula les diferències en la zona del TAR. En el domini conservat N-terminal, en canvi, només s'hi pot apreciar 27 diferències d'aminoàcid -de 163 que la conformen-, de les quals 13 són delecions d'aminoàcid al llarg de la seqüència.

QSNAM		GRPGRYFFSMDRDK	14
STNAC103	MEEN LPPGFRFHPTDEELITYYLN NKVSDFNFTARA ITD V DLNKSE P WDL PAKAS MGEKEWYFFSLKDRK		70
Consensus GrkerYFFS\$ rDRK		
QSNAM	YPTGLRTNRATEAGYWKTTGKDKEI FRAG--VL VGMKKT LVFYK GRAPRGEKSNWVMHEYR LEN KHPFKS		84
STNAC103	YPTGLRTNRATEAGYWKTTGKDKEI FRGG TGVI.VGMKKT LVFYR GRAPKGEKT NWVM HEYRI ET RFGYKP		140
Consensus	YPTGLRTNRATEAGYWKTTGKDKEIFRaG.VLVGMKKT LVFYr GRAPrGEKs NWVM HEYRiEnrhg%Kp		
QSNAM	SKEEWVCRV FQ KS A-MKKP QQT P STLPS LES PCDTN-SIVNE FGD IELP-NLN NI ANS-SSG FSN ISPH		154
STNAC103	SKEEWVCRV FQ KS STVKKPQTSSS PL SLE SPCD TNYTIANE LGDI ELPFNFNYLTTT PS STINN IS LH		210
Consensus	SKEEWVCRV FQ KS a.m KKPQqTps l SLE SPCD TN.sIANE LGDI ELP.NLNni ans. SSgin IS LH		
QSNAM	SYNSD NNIN MNMN MN WA AV REAAAA SL- PSL SW PSLL SS GLS-VNS LL LKAL QLR NYQ SRD-AT STS		224
STNAC103	NYND--NINL AAAA-- AATREAAA ANT PLLPWSS NLV SSNLSSVNS LL FRAL QLR GYSP RE QATS ST		280
Consensus	nYNnDnn NIN m aaaa... Aat REAAA anl.PLP W ps N l SS nLS.VNS LL lr AL QLRnYqs Rr #AT S ss		
QSNAM	IFC		226
STNAC103	TTTH DYAF M LPQ ENIL TT Q FG ND FA VNSIGAPSS SMAL DN SV HQQP QE Q LY KL DSD IL		338
Consensus	ifc		

Figura 12 Alineament de les seqüències proteïques d'StNAC103 i el seu ortòleg de Q. suber. En taronja hi apareixen, per ordre, els subdominis A-E; el subratllat correspon a la regió més conservada de la proteïna; en morat els canvis aminoacídics no conservatius. En la seqüència consens, el caràcter % significa la igualtat de probabilitats entre F i Y per ocupar aquella posició, i # per a NDQEBZ.

També s'ha comparat les seqüències d'aminoàcids d'StNAC103 amb l'EST disponible de l'ortòleg de surera (NCBI EE743827) (Figura 12). A partir de l'EST de surera s'ha pogut traduir 226 aminoàcids, mentre que StNAC103 té 338 aminoàcids. És rellevant esmentar que en la seqüència de surera hi manquen els subdominis conservats A i B del domini NAC, així com una regió situada a l'extrem del domini C-terminal. Si es compara solament la regió que disposem de l'EST de surera, es pot observar un 66 % d'identitat i un 77 % de similitud. Comparant les dues seqüències s'ha trobat 79 substitucions aminocídiques. D'aquests, s'ha estimat que 56 eren substitucions no conservatives, ateses les diferents característiques pel que fa l'hidrofobicitat, la càrrega i la similitud del radical, o bé perquè s'introdueixen aminoàcids en una de les seqüències. En el domini conservat s'hi ha trobat un total de 20 substitucions aminoacídiques, 9 de les quals es creu que són no conservatives, ja sigui per la càrrega (R/E58, R/W61, H/F80), la mida (P/K59), càrrega i mida (G/E60), polaritat i mida (P/G81, S/P84) o bé la introducció d'aminoàcids (-/T100, -/G101). Quatre d'aquestes substitucions, estan allotjades al subdomini C de la proteïna, mentre que la resta de substitucions no conservatives es troben fora dels subdominis A-E. Pel que fa a les substitucions d'aminoàcids conservatives dins el domini conservat, en trobem dues en el subdomini C i 4 en el D. Els percentatges d'identitat i similitud del domini NAC són de 80 % i 88 % respectivament, si es té en compte només la regió comparable.

En el domini TAR s'observa una identitat del 55 % i una similitud del 67 %, si es té en compte només la regió comparable. Dins els canvis aminoacídics del domini TAR, se'n troben 13 de conservatius i 47 de no conservatius. N'hi ha que es donen primer en un sentit i després en l'altre, per exemple, a StNAC103 hi trobem L168 i P169, mentre que els seus homòlegs a QsNAC són P102, L103. Alguns d'aquests canvis conservatius es repeteixen més d'un cop -en un sentit o altre-. És el cas d'S/P (4 substitucions), Q/P (2), T/S (5), L/F (2), I/L (2), S/N (5), P/L (3).

1.4. Discussió

L'StNAC103 és un factor de transcripció NAM amb localització nuclear, tal com avalen la predicció de motius funcionals (ELMFSP) que indica la presència de dominis FHA, abundants en proteïnes nuclears, així com la resta d'eines de predicció de localització subcel·lular utilitzades (Wolfpsort, ESLpred i TargetP), i de manera experimental, l'estudi de Garrote Gironès (2013). A més d'aquests resultats, cal remarcar la manca de dominis transmembrana en la proteïna i de localitzacions de palmitoilació i prenilació.

El grup filogenètic on està ubicat l'ortòleg d'StNAC103 en *Arabidopsis* (ANAC058), i al qual pertanyen els gens CUC1, CUC2 i CUC3 d'*Arabidopsis*, correspon a un dels més antics ja que és present en totes les plantes terrestres -des de les moltes fins a les dicotiledònies-, mentre que altres grups filogenètics són presents només en les plantes vasculares o, fins i tot són específics de monocotiledònies o dicotiledònies. Això fa pensar que StNAC103 pugui estar regulant funcions clau per al correcte desenvolupament cel·lular. Ho reafirma el fet que en altres espècies, com *Arabidopsis*, la branca NAM/CUC de factors de transcripció té expressió i controla, els límits d'òrgans de plantes (Souer *et al* 1996, Aida *et al* 1997, Sablowski i Meyerowitz 1998, Hibara *et al* 2003, Blein *et al* 2008, Raman *et al* 2008, Vialette-Guiraud *et al* 2011), com són l'establiment de meristemes, la separació d'òrgans -lòbuls de les fulles- i desenvolupament d'òvuls. En el cas de CUC1 i 2, que es dona un cas d'especialització de la funció, la mutació en aquests gens NAC dona lloc a malformacions en els cotiledons. En concret, els mutants *cuc* presenten els cotiledons fusionats en forma de copa (Aida *et al* 1997, Takada *et al* 2001, Vroemen *et al* 2003, Ishida *et al* 2000, Aida *et al* 2002, Daimon *et al* 2003).

Dins el grup NAM/CUC a *Arabidopsis*, hi ha diversos gens caracteritzats amb funcionalitats diverses. Estan involucrats en l'establiment de límits entre els teixits (CUC1, Hibara *et al* (2003); CUC2, Aida *et al* (1997); i CUC3, Vroemen *et al* (2003)), una varietat de processos de desenvolupament de teixits (Hu *et al* 2010, Ko *et al* 2007, Li *et al* 2013, Quach *et al* 2014) o cel·lular (Hussey *et al* 2011), resposta hormonal (Xie *et al* 2000, Christiansen *et al* 2011, Le Héanff *et al* 2013, Pei *et al* 2013), la resposta a l'estrès (ANAC038/39), la mort cel·lular programada per estrès (ANAC087, Jaspers *et al* (2009)), la senescència (ANAC059 i ANAC092, Balazadeh *et al* (2011)), el control de l'expansió i la paret cel·lular regulada mitjançant etilè (ANAC100, Pei *et al* (2013)), entre altres. Així, en gens paràlegs que realitzen funcions similars a *Arabidopsis* es troben motius conservats -dins de la regió TAR- com per exemple a ANAC059 i ANAC092, que defineixen els límits dels teixits i comparteixen els motius LP, V i W. En general, dins el domini C terminal de la subfamília CUC, els dominis V, L i W estan ben conservats (Ooka *et al* 2003, Jensen *et al* 2009, Singh *et al* 2013), excepte en el subclade on es troba ANAC058 (Taoka *et al* 2004) del qual formaria part StNAC103, que no presenta aquests motius. Dins de l'anàlisi de motius, és interessant remarcar que StNAC103 i StNAC057 comparteixen 4 dels 6 motius específics que posseeix StNAC103 en el domini TAR (Figura 11). A més

d'aquestes similituds, StNAC057, com StNAC103, té com a possible ortòleg en Arabidopsis, ANAC058 i en el filograma que s'ha elaborat, StNAC057 es troba dins el mateix clade on està arrelat StNAC103, que equival als grups II-3/NAC-c (Jensen *et al* 2009, Singh *et al* 2013). Malgrat això, un alineament de les seqüències d'StNAC103 i StNAC057 mostra un 39 % de diferències (17 % al domini NAC i 52 % al TAR). En conjunt, aquestes dades indiquen que StNAC103 i StNAC057 es podria tractar de gens provinents d'un ancestre comú. En tot cas, ambdós factors de transcripció podrien estar desenvolupant tasques similars de regulació en patatera. Les seves similituds en referència als motius compartits suggeririen unes funcions proteiques similars. Les dades d'RNA seq (The Potato Genome Sequencing Consortium *et al* 2011) indiquen que StNAC103 i StNAC057 tenen algunes similituds en el patró d'expressió en un dels dos haplotips que tracta l'estudi, la varietat doble monoploide, però no així en l'haplotip heterozigòtic. En l'haplotip doble monoploide StNAC103 s'expressa a tubercle sencer, arrel i call, mentre que a la resta de teixits no s'expressa de manera constitutiva. StNAC057 s'expressa als mateixos teixits i a més, a punta d'estoló. Per altra banda, les mateixes dades indiquen que StNAC057 no estarà regulat per hormones, com sí que ho està StNAC103, que s'indueix per ABA, GA i BAP (citoquinina). En canvi, en la varietat heterozigot del mateix treball, StNAC103 s'expressa a plantes *in vitro*, arrel, pell de tubercle i tubercle madur, i StNAC057 en cap teixit.

En referència a la comparació de les seqüències de residus d'aminoàcids dels ortòlegs d'StNAC103, es vol fer èmfasi en l'alta similitud que presenta respecte SINAC, tant pel que fa la seqüència de residus d'aminoàcids, com pels motius específics del grup XI d'StNAC que conté. En aquest sentit crida l'atenció les diferències d'acumulació de transcrit que presenten patatera i tomaquera respecte a fulla, ja que StNAC103 (capítol 3) s'expressa en arrel i pela de tubercle, mentre que SINAC s'expressa en les arrels i en les fulles.

La comparació d'StNAC103 amb QsNAC, posa de manifest una gran similitud (77 %) en la seqüència comparable del domini conservat NAC, i una identitat de la seqüència total comparable (66 %) superior a la identitat de l'alineament entre StNAC103 i StNAC057 (61 %) -la seqüència d'StNAC més propera a StNAC103-. Dintre de les diferències que QsNAC presenta respecte StNAC103, una part es tracta d'un seguit de canvis conservatius (11 % respecte el total de residus). En referència a la regió TAR, entre les seqüències d'StNAC103 i QsNAC es pot apreciar una identitat del 55 % dels residus i una similitud del 67 % (Figura 12). En el domini NAC, en canvi, s'aprecia una identitat entre les dues seqüències del 80 %, i una similitud del 88 %. Això suposa una variació entre dominis del 25 % de la identitat i el 21 % de la similitud. Aquest resultat dóna suport a la idea que en la divergència, aquests gens haurien acumulat més diferències en la regió d'activació de la transcripció i, en conseqüència, podria ser que desenvolupessin la seva funció en moments diferents o sota unes xarxes de regulació diferents. Tanmateix, també cal remarcar que QsNAC i StNAC057 comparteixen tres dels motius específics que conté StNAC103 en el domini TAR. Dels altres tres motius que QsNAC no conté, el 20' s'ha trobat només en NAC de solanàcies mentre que la diferent presència del 13' i el 8' és probable que estigui també relacionada amb una regulació diferencial del factor de transcripció.

Una altra similitud remarcable és la que hi ha entre StNAC103 i StNAC047, que malgrat pertànyer a subgrups filogenètics diferents (l'un al NAC-c i l'altre al NAC-h, segons Singh *et al* (2013)), comparteixen fins a tres motius específics en la regió TAR, dels trobats dins el subgrup XI. D'aquests, el 20' i el 13' només són presents als possibles ortòlegs d'StNAC103 i el 20', també a StNAC057. Són doncs, motius molt específics que poden assenyalar aspectes diferencials crítics pel que fa a la configuració espacial, possibles proteïnes associades, modificacions post-traduccionals o regulació d'aquests factors de transcripció.

En referència a l'estructura de la proteïna StNAC103, s'ha vist que la predicció de l'estructura tridimensional *in silico* dóna suport al model descrit fins al moment (Ernst *et al* 2004) per als factors de transcripció NAC i que el domini TAR es trobaria desorganitzat de forma nativa (Jensen *et al* 2009), com també hi dóna suport la presència d'un domini d'unió a la subunitat 1 de la fosfatasa, que es sol trobar en polipèptids desordenats de forma nativa. Alternativament o addicional, aquest domini podria donar lloc a situacions de regulació per defosforilació com el descrit per Guan *et al* (2014).

També és remarcable, que segons la predicció *in silico* de motius funcionals, el domini TAR presentaria la major part de localitzacions de fosforilació i glicosilació. A més, els motius funcionals predits amb eines bioinformàtiques indiquen que podria servir d'ancoratge a proteïnes reguladores, de modificació post-traduccionals, i amb funcions lligades a la regulació del cicle cel·lular. En definitiva, pel que fa a la seva regulació, StNAC103 es podria modificar post-traduccionalsment i interaccionar amb proteïnes acompanyants. L'estabilitat del missatger d'StNAC103 sembla que no es veuria afectada per miRNAs. Precisament una de les dianes de miRNA és el motiu V (Kasschau *et al* 2003), que StNAC103 no posseeix. Tampoc es van trobar dianes a StNAC103 per als miRNA descrits per Lakhota *et al* (2014) en base a la seqüenciació dels miRNAs presents en fulla, tija, arrel i quatre estadis de desenvolupament del tubercle en patatera.

Finalment, és interessant notar que el temps de vida mig de la proteïna pot ser força elevat ja que es prediu la presència de dominis funcionals de lligament a proteïnes desubiquitinadores i tampoc s'ha identificat una seqüència PEST que apunti a una reducció de vida de la proteïna.

Capítol 2

Anàlisi química, estructural i de transpiració del periderma modificat per *StNAC103*

Sumari

Objectiu: *StNAC103* va ser aïllat d'una llibreria de fel·lema molt enriquida en gens de la via de síntesi de suberina i ceres i s'expressa específicament en cèl·lules del fel·lema, per la qual cosa és un possible candidat a la regulació de la síntesi i deposició dels lípids que caracteritzen el fel·lema. Per demostrar o descartar una possible acció reguladora d'*StNAC103* s'ha analitzat l'efecte del silenciament o la sobreexpressió d'aquest gen en el perfil de lípids, la permeància hídrica i la ultraestructura del periderma en tubercles de patata transformats.

Metodologia: Aïllament per digestió enzimàtica del periderma de patates amb sobreexpressió, silenciament específic i silenciament conservat d'*StNAC103*. Determinació quantitativa i qualitativa dels components de la suberina i ceres per CG-FID. Observació de les característiques histològiques i la ultraestructura per microscòpia electrònica. Determinació de la permeància hídrica per tècnica gravimètrica.

Resultats i conclusions: El silenciament d'*StNAC103*, tant l'específic com el conservat, té un efecte significatiu en la quantitat total i el perfil de lípids del periderma que és més marcat en el silenciament conservat. A les ceres s'observa un increment de la quantitat total, que es relaciona amb una pujada dels alcans. En la suberina s'observa també un augment en la càrrega total, en els alcohols, els ω -hidroxiàcids i l'àcid ferúlic. En canvi, no es van poder observar efectes en la sobreexpressió. Les conclusions que s'extreuen és que *StNAC103* és un regulador negatiu de la síntesi de suberina i ceres al periderma. D'altra banda, els canvis en la composició de lípids no tenen efectes detectables pel que fa a la permeància hídrica ni l'estructura o l'ultraestructura del fel·lema.

2.1. Introducció

El factor de transcripció QsNAC va ser identificat en una llibreria d'hibridació subtractiva i de supressió, la qual estava enriquida en gens relacionats amb la formació del periderma de surera, com ara gens de biosíntesi de suberina i ceres i gens d'estrès (Soler *et al* 2007). Donat que aquest gen estava induït en fel·lema respecte a xilema i podia tenir un paper rellevant en la regulació del fel·lema, es va buscar la seqüència codificant sencera de l'ortòleg de patata (Soler 2008), i tenint en compte el treball de Singh *et al* (2013) s'anomena *StNAC103*.

StNAC103 forma part de la família NAC (formada pels subgrups NAM, ATAF i CUC), una família molt extensa de factors de transcripció vegetals i que regula una varietat de processos de desenvolupament com per exemple desenvolupament floral, desenvolupament vascular, senyalització hormonal i estrès biòtic i abiòtic.

Per tal d'aclarir el paper regulador d'*StNAC103*, s'observa com els nivells d'expressió del gen afecten al fenotip del periderma, ja sigui a nivell de composició química de ceres i suberina, de la ultraestructura de la paret suberificada o la fisiologia d'aquest periderma. En aquest sentit, l'ús de plantes modificades genèticament per tal de sobreexpressar o silenciar *StNAC103* és d'utilitat per entendre millor la seva funció molecular i/o fisiològica.

En altres estudis s'ha trobat que el silenciament de gens estructurals de les vies de biosíntesi de ceres i suberina compromet les propietats químiques, físiques i fisiològiques de la suberina i les ceres del fel·lema. Així, Serra *et al* (2009b) demostren que l'expressió de *CYP86A33* és essencial per a la correcta estructuració de les lamel·les de suberina i que el seu silenciament afecta la composició lipídica de la suberina i de forma substancial la permeabilitat del periderma. *CYP86A33* és un enzim clau per a la ω -hidroxilació dels lípids que formaran part de la suberina. Igualment, en un altre estudi Serra *et al* (2009a) evidencien que l'expressió d'*StKCS6* permet una major acumulació d'àcids grassos i derivats de cadena molt llarga. La manca d'aquest enzim porta a un increment moderat de la transpiració del periderma i no té efectes a nivell de distribució lamel·lar de la suberina.

Per tal de modificar els nivells d'expressió d'*StNAC103* es van generar línies transgèniques estables de silenciament i sobreexpressió. El silenciament específic del gen permet demostrar de forma clara els efectes fenotípics que provoca la pèrdua de l'expressió del gen. No obstant, en gens de famílies multigèniques, a vegades és difícil de veure'n l'efecte fenotípic si hi ha altres gens que s'expressen en el mateix teixit i en complementen la funció. Com s'ha esmentat anteriorment, els gens de la família NAC de factors de transcripció formen part d'una extensa família on els fenòmens de redundància funcional s'han

acreditat (Raman *et al* 2008). Per tal d'evitar la possible complementació de la funció del gen per altres paràlegs, es va procedir a silenciar una zona conservada del gen i també a sobreexpressar el gen de forma ectòpica. Així doncs per *StNAC103* s'ha obtingut tres tipus de construccions, les que generen el silenciament d'una zona específica del gen, el silenciament d'una zona conservada i la sobreexpressió del gen (Soler 2008). El silenciament s'aconsegueix mitjançant l'expressió sota control del promotor 35S de *Cauliflower Mosaic Virus* d'un fragment d'RNA palindròmic que desencadena el mecanisme d'RNA d'interferència i genera petits RNAs interferents, que són complementaris a un tros de 200-300 pb de l'mRNA del gen o gens. La sobreexpressió del gen també s'obté mitjançant el promotor 35S de CaMV, el qual controla l'expressió de la zona codificant sencera del gen de patatera.

Paral·lelament a l'elaboració d'aquesta tesi, i per tal de disposar de més dades per entendre la funció d'*StNAC103*, es va comparar el transcriptoma de les línies silenciades amb la línia salvatge (Mercè Figueras, comunicació personal). S'ha fet dues anàlisis a partir de dos lots diferents de plantes a través de la plataforma Illumina. En el primer lot es va comparar el transcriptoma de la línia NSC 1 i la salvatge, amb dues rèpliques biològiques en cada cas, que corresponien cadascuna al pool de quatre individus diferents. En aquesta seqüenciació es van fer lectures pels dos extrems de 75 pb i a cada carril es va carregar un màxim de dues llibreries. La seqüenciació del cDNA es va realitzar al CNAG (Centre Nacional d'Anàlisi Genòmiques) i el tractament de les dades crues al CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica) i a la Universitat de Michigan, en col·laboració amb els investigadors Marc Valls i Robin Buell. L'anàlisi dels gens d'expressió diferencial es va obtenir a través del programa Cuffdiff, amb un FDR<0,05. A més, i per trobar les diferències robustes es va filtrar per log2 ratio d'1,5 i un valor de p de 0,001. En aquesta anàlisi es van trobar 1477 gens diferencials. En el segon lot es va comparar el transcriptoma de les línies NSC 31, NSE 43 i salvatge. En cada línia també es van usar dues rèpliques biològiques que corresponien a una barreja de quatre individus diferents –cada rèplica-. En aquesta seqüenciació les lectures van ser de 50 pb i pels dos extrems, i a cada carril es va carregar tres llibreries. La seqüenciació del cDNA i el tractament de les dades crues va tenir lloc al CRG (Centre de Regulació Genòmica), mitjançant el programa Cuffdiff2 i un FDR<0,05. En aquesta segona anàlisi es detecten 724 gens diferencials entre NSC 31 i la línia salvatge, i 183 gens diferents entre NSE 43 i la salvatge.

L'ús del model de patatera permet treballar fàcilment amb “membranes de periderma” o “peridermes”, les quals són de fet, porcions de fel·lema aïllades per mitjà de la digestió amb enzims que lisen la cel·lulosa i les pectines de la paret. Les parets del fel·lema resisteixen l'efecte dels enzims cel·lulolítics degut a la impregnació de suberina, mentre que les cèl·lules del parènquima del tubercle, el fel·logen i la fel·loderma són eliminades com a conseqüència de la degradació de la seva paret cel·lular. Aquesta facilitat per a obtenir teixit suberitzat pràcticament pur i en quantitats suficients per a l'anàlisi fa d'aquest model un bon candidat per a l'estudi de la suberina i el fel·lema.

La composició química de la suberina i les ceres de periderma de tubercle ha estat ben caracteritzada (Kolattukudy i Dean 1974, Kolattukudy i Agrawal 1974, Dean *et al* 1977, Cottle i Kolattukudy 1982, Holloway 1983, Graça i Pereira 2000, Schreiber *et al* 2005, Serra *et al* 2009a, Serra *et al* 2009b) i els mètodes d'extracció i anàlisi de suberina i ceres permeten la quantificació de cadascun dels components lipídics. En aquest treball, el mètode d'extracció de la suberina utilitzat ha estat la metanolisi, segons el protocol descrit per Schreiber *et al* (2005) i també Serra *et al* (2009a), Serra *et al* (2009b), amb metanol i trifluorur de Bor.

2.2. Material i mètodes

Material biològic

Les línies de la varietat Desirée es van transformar amb diferents construccions que van permetre la sobreexpressió i silenciament -específic i conservat- del gen *StNAC103*. L'obtenció d'aquestes plantes transformades va ser prèvia a aquesta tesi (Soler 2008). Pel silenciament específic es va escollir una zona única del gen *StNAC103*, de 253 pb que conté majoritàriament el domini TAR (veure Figura 1, Capítol 1), i per al silenciament conservat la zona d'elecció formava part del domini NAM que es troba a l'extrem N-terminal i correspon a 229 pb. Aquestes seqüències es van incorporar dues vegades, i en sentit oposat, en el vector pBIN19RNAi (Serra *et al* 2009b), el qual permetia produir un RNA amb capacitat de formar un palíndrom i, per tant, desencadenar el mecanisme d'RNAi de forma constitutiva.

Per produir la sobreexpressió d'*StNAC103* es va utilitzar el vector pBINAR, al qual s'hi va incorporar la seqüència codificant sencera d'*StNAC103* sota control del promotor 35S de CaMV. En conseqüència, aquest gen es sobreexpressava de forma constitutiva i ectòpica.

En el marc d'aquesta tesi s'ha comprovat la sobreexpressió i silenciament de les línies en qüestió.

Obtenció de les “membranes de periderma” per a les anàlisis

Les anàlisis químiques de suberina i ceres, i de permeància hídrica, requereixen l'obtenció de teixit suberitzat (fel-lema) aïllat en quantitats suficients. Com s'ha explicat anteriorment, el fel-lema és la capa externa del periderma. Aquest s'obté del tubercle de patata i de manera relativament fàcil, per digestió enzimàtica. Després de la digestió roman la capa de teixit suberitzat en forma de làmina o “membrana de periderma”, tal com són anomenades habitualment a la literatura (Vogt *et al* 1983, Schreiber *et al* 2005, Serra *et al* 2009b) o simplement “peridermes”. En aquest treball, per tal de conservar la nomenclatura habitual les anomenarem sempre “membranes de periderma”.

Les quantitats totals de periderma utilitzades per a cada anàlisi estaven entre els 3 i els 9 mg perquè es va utilitzar dos peridermes. Per tal d'assegurar que els resultats fossin deguts a la construcció i no al lloc d'inserció del T-DNA, es van emprar entre 2 i 4 esdeveniments independents de transformació. Per cada esdeveniment de transformació es van utilitzar d'1 a 4 rèpliques biològiques.

De cada tubercle, mitjançant un *cork borer* es varen obtenir discs superficials de teixit -periderma i parènquima- sense lenticel·les i de 10 mm de diàmetre. Els discs es van tractar durant 4 dies amb una barreja al 2 % (v/v) de cel·lulasa (Sigma) i 2 % (v/v) de pectinasa (Sigma), dissoltes en tampó citrat 10^{-2} M (pH 3.0, ajustat amb KOH). Es va afegir a la barreja azida sòdica (Sigma) com a bactericida. La solució enzimàtica es va canviar 2 o 3 vegades en 4 dies, fins que no presentava terbolesa. Un cop s'ha degradat la cel·lulosa i les pectines, romanen únicament les capes cel·lulars del fel·lema amb les parets impregnades de suberina, o membranes de periderma. A continuació es procedia a rentar-les acuradament en tampó fosfat (2×10^{-2} M, pH 9.0) durant 24 h, seguides d'un nou rentat amb aigua desionitzada també de 24 h. Totes les incubacions es duien a terme a temperatura ambient i en agitació (30 rpm).

Les membranes de periderma que es van obtenir procedien de periderma madur -de tubercles emmagatzemats durant almenys 21 dies-. Es van conservar seques fins a la utilització i van ser pesades abans d'usar-les.

Anàlisi gravimètrica de la permeància hídrica

Per tal de mesurar la permeància hídrica es va emprar el sistema gravimètric habitual descrit a la literatura (Schönherr i Lenzian 1981, Vogt *et al* 1983, Schreiber i Riederer 1996, Schreiber *et al* 2005). Les membranes de periderma es van hidratar amb aigua desionitzada durant 24h. Per evitar els efectes de les lenticel·les en les mesures de permeància hídrica es van utilitzar fragments de membranes de periderma que no tenien lenticel·les. Aquestes membranes de periderma es van col·locar en cambres de transpiració d'acer inoxidable que contenien 300 μ l d'aigua i una superfície de transpiració de 6,5 mm de diàmetre (Figura 14). La cara interna de la membrana donava a l'interior de la cambra i l'externa donava a l'exterior. Les cambres de transpiració es van col·locar de tal manera que l'aigua reposés sobre el periderma i es van mantenir a la foscor en un recipient hermètic que contenia gel de sílice. Aquestes caps es van guardar a temperatura ambient i la pèrdua de pes deguda a l'evaporació de l'aigua a través de les membranes de periderma es va determinar en intervals regulars de 2-3 dies durant 30 dies per mitjà d'una balança analítica (HR-60 from A&D). La cinètica de transpiració es va obtenir representant la quantitat d'aigua que difon a través del periderma al llarg del temps. La permeància hídrica (P , $m s^{-1}$) es va calcular a partir de la pendent (F , $g s^{-1}$) obtinguda de la regressió lineal de les dades i a través de l'equació $P = F \times (A \times \Delta c)^{-1}$, on A ($2,83 \times 10^{-3} m^2$) representa l'àrea d'intercanvi i Δc ($10^6 g m^{-3}$) representa la força impulsora que aporta la concentració d'aigua dins la cambra (Schreiber *et al* 2005, Serra *et al* 2009a). Es van seleccionar per a representació i anàlisi només les dades que presentaven una regressió en la pèrdua d'aigua d' $R^2 \leq 0,99$.

Anàlisi de suberina i ceres

A partir de les membranes de periderma es va procedir a l'extracció de ceres i posteriorment a l'alliberació dels monòmers de la suberina per transesterificació. Els components de ceres i suberina obtinguts van ser derivatitzats per tal de poder analitzar-los mitjançant la cromatografia de gasos. La identificació dels diferents compostos es va realitzar mitjançant el cromatògraf de gasos acoblat a l'espectrofotòmetre de masses (GC-MS) i la quantificació es va fer a través de cromatografia de gasos acoblada a un detector per ionització de flama (GC-FID), segons la metodologia descrita anteriorment (Schreiber *et al* 2005, Serra *et al* 2009a). Tots aquests protocols s'han posat a punt a la UdG gràcies a la col·laboració amb investigadors de l'àrea de química analítica.

Extracció de les ceres

Les ceres es varen extreure de les membranes de periderma mitjançant 900 µl d'una barreja 1:1 (v/v) de cloroform i metanol, a temperatura ambient durant 18 h en agitació, a 300 rpm, en vials de vidre per a cromatografia (SigmaAldrich) i *septum* de silicona i PTFE. Paral·lelament es va preparar un tub de blanc per poder detectar possibles contaminants dels reactius o recipients utilitzats. Un cop recuperat l'extracte de ceres, s'hi va afegir 1,976 µg de tetracosà (Fluka), com estàndard intern de tot el procés. La mostra es va assecar sota flux de nitrogen gas i es va guardar a 4°C abans de ser derivatitzada.

Extracció dels compostos esterificats de la suberina

Un cop extretes les ceres, les membranes de periderma es varen deixar assecar 24 h en un dessecador que contenia gel de sílice i a continuació es va procedir a la transesterificació de la suberina. Per dur a terme la transesterificació es va cobrir l'extracte de periderma sec amb 2ml de trifluorur de bor (BF₃) al 10 % en metanol (Fluka), i es va incubar el material a 70°C durant 18 h. La solució de BF₃ en metanol es guardava en una atmosfera de gas de nitrogen i en la nevera. Per tal de prevenir la producció d'artefactes es van utilitzar solucions de BF₃/metanol que no tinguessin més de 3 setmanes des de l'obertura de l'ampolla (Kolattukudy i Agrawal 1974, Zeier i Schreiber 1999) i que es sotmetia a un flux d'N₂ gas mentre es procedia a prendre la solució. Es va afegir 10 µg de dotriacontane (Fluka) com estàndard intern. Aquesta solució es va transferir a un nou vial que contenia 2 ml d' hidrogen carbonat de sodi saturat. Els peridermes tractats amb BF₃ es van

rentar dues vegades amb 1,5 ml de cloroform per acabar de recuperar els monòmers alliberats de la suberina i aquestes solucions es van transferir al vial que contenia l'extracte de suberina. El volum d'extracció es va transferir a un vial amb 2ml d'aigua miliQ saturada amb NaHCO_3 . Es va tancar i agitar amb vòrtex la solució i es va deixar separar les dues fases, l'orgànica i la inorgànica. La fase inferior –orgànica- es va transferir en un nou tub perquè era la fase que conté els lípids i derivats. A aquesta fase orgànica s'hi va afegir 1 ml d'aigua, es va agitar amb vòrtex i es va eliminar la fase superior -aquosa-. Aquest procés es va repetir una vegada. Es va afegir pols de sulfat de sodi anhidre fins deshidratar la mostra -quan el sulfat de sodi anhidre ja no forma agregats-. El solvent restant, que constituïa l'extracte de suberina, es va transferir a un nou tub i es va mantenir a 4°C abans de ser derivatitzat.

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

Els components obtinguts de ceres i suberina es varen 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. La derivatització es va dur a terme just abans de l'anàlisi per GC per evitar-ne la degradació progressiva. Els extractes de suberina i ceres es van assecar per flux d' N_2 gas i es varen tractar amb una barreja 1:1 (v/v) de piridina i BSTFA -20 µl de piridina (GC-grade; Merck) i 20 µl de BSTFA (Macherey-Nagel) durant 40 min a 70 °C. Tot seguit els productes derivatitzats es varen diluir amb 60 µl de cloroform les ceres, i 80 µl la suberina, per a obtenir la concentració d'ús adequada per a GC, i es van transferir als tubs per a GC.

Identificació i quantificació dels components extrets de suberina i ceres

Els productes derivatitzats (TMS) es varen identificar en el Laboratori del Suro per part de la Senyora Dolors Company (dades no publicades) amb un cromatògraf de gasos i un detector selectiu de masses amb trampa iònica (Trace GC 2000 series acoblat a un espectròmetre de trampa de masses Polaris Q, de Thermo Scientific Waltham, MA, USA). L'espectre de masses obtingut de l'impacte electrònic per a cada pic del cromatograma es va comparar amb les dades publicades prèviament (Kolattukudy i Agrawal 1974, Zeier i Schreiber 1997, Zeier i Schreiber 1998). D'aquesta manera a cada pic del cromatograma, en funció del temps de retenció, se li podia assignar una molècula determinada. La quantificació de cadascuna d'aquestes molècules en les diferents mostres analitzades es va realitzar a través de GC-FID (Shimadzu GC-2010 Plus, Kyoto, Japan). Per a la quantificació es va usar estàndards interns (1,976 µg de tetracosane per a les ceres i 10 µg de dotriacontane per a la suberina).

Per a les anàlisis es va usar un mínim de 2 esdeveniments de transformació diferents per a cada tipus de transformació i per cada esdeveniment, en general 3 o 4 rèpliques biològiques (excepte per a les línies NO₂, que se'n va usar 2).

Microscòpia

Per a la microscòpia electrònica de transmissió (TEM), fragments d'1x1 mm² que contenien periderma i parènquima de tubercle, van ser submergits en un tampó de cacodilat sòdic 100mM (pH 7) que contenia 2,5 % de glutaraldehyd (pes:volum) i 2 % de paraformaldehyd (pes:volum) de 2 a 4 hores per a la fixació del teixit. Es va aplicar buit fins que les mostres es van submergir. El teixit es va rentar tres vegades amb 100 mM de tampó cacodilat de sodi (pH 7) i subseqüentment va ser fixat tota la nit amb tampó cacodilat sòdic que contenia un 1 % (pes:volum) de tetròxid d'osmi. Les mostres es van rentar amb tampó cacodilat sòdic, es van deshidratar mitjançant una sèrie d'acetona (30 %-100 % en etapes d'un increment del 10 % i 10 minuts en cada etapa). Les mostres es van incloure en resina d'epòxid Spurr (1:2, 1:1 i 2:1 resina:acetona (v:v) i resina pura durant 4 h, tota la nit, 3 i 5 h, respectivament). El teixit infiltrat es va posar en motlles i es va incubar a 60°C durant 2 dies. Els talls -tant semifins com fins- es van obtenir a través d'un ultramicròtom RMC MT-XL (Tucson, EUA). Els talls fins es van recuperar en un portaobjectes de malla de coure, es van tenyir amb un 2 % d'acetat d'uranil (pes:volum) durant 15 min i es van rentar durant 30 minuts. Tot seguit es van observar amb un TEM ZEISS EM910 (Alemanya) a un voltatge d'acceleració de 60 kV. Les imatges van ser preses amb una pel·lícula Kodak Electron Microscope 4489 i van ser escanejades a través d'HP 6100C (Hewlett-Packard).

Tests estadístics

Per a l'estadística comparativa dels resultats es va emprar totes les dades conjuntament -per cada construcció o les salvatges-, excepte quan una de les rèpliques d'una línia s'apartava de la resta, que es comportaven de la mateixa manera entre sí. En aquest cas, la rèplica era descartada.

Es va transformar les dades quantitatives amb el mètode logarítmic per, tot seguit, comprovar en quin cas complien els supòsits de normalitat i homoscedasticitat, si abans o després de la transformació. La comprovació de la normalitat de les dades es va dur a terme tant sobre els residus no tipificats de cada línia transgènica, com pel global del mutant -silenciament específic, silenciament conservat i sobreexpressió- o les salvatges. Quan no es complia el supòsit de normalitat o el d'homoscedasticitat -ni per les dades transformades ni per les naturals-, s'ha emprat el test no paramètric Kruskal-Wallis. Si es complien els supòsits de normalitat i homoscedasticitat, s'ha procedit a realitzar una ANOVA sobre les dades -a través del paquet estadístic SPSS-. El nivell de significació base (0,05) s'ha corregit per Bonferroni degut a la multiplicitat d'anàlisi que s'ha dut a terme, un per a cada compost o suma de compostos. Els diferents nivells de significació corregits, així com els valors de p , es mostren a l'Annex I. Alhora, s'ha establert un nivell de significació molt significatiu equivalent a dividir el valor significatiu per 50.

Quan es trobava diferències significatives entre grups, s'ha avaluat quines mostres diferien significativament entre sí per mitjà de l'anàlisi *post hoc* HSD de Tukey (Annex I). En aquest cas, els valors significatiu i molt significatiu s'estableixen en 0,05 i 0,005 per a totes les anàlisis, tal com es presenten en les figures.

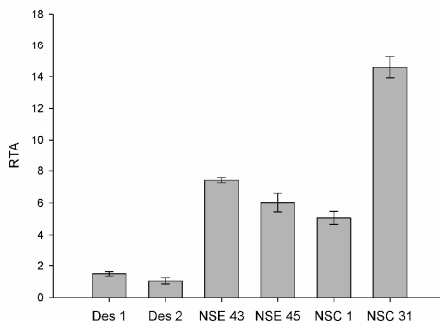
2.3. Resultats

Anàlisi de l'acumulació de transcrit d'StNAC103 en les línies silenciades

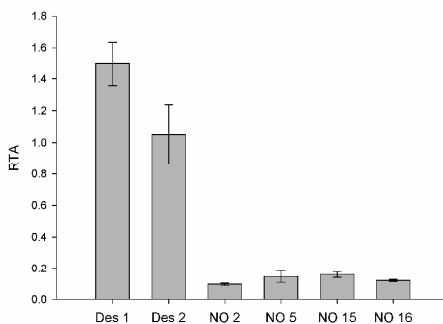
Durant l'organogènesi de les plantes transformades es va seleccionar les que havien incorporat el T-DNA mitjançant la selecció amb kanamicina, tot i així calia comprovar el silenciament/sobreexpressió del gen en cada cas. A més, i per tal que el resultat fos més robust, la comprovació es va dur a terme a partir de dos lots de plantes diferents i es van seleccionar aquelles línies que han mostrat una acumulació de transcrit alterada en tots dos lots. Anteriorment a aquesta tesi es van seleccionar les línies del silenciament conservat i sobreexpressió. En aquesta tesi es va realitzar els dos cribratges convenients per seleccionar les línies NSE. En la Figura 13 es mostra l'acumulació relativa de transcrit de les línies que s'ha analitzat pel que fa a la composició química del periderma. Aquesta anàlisi s'ha realitzat a través de PCR a temps real. Cada mostra correspon a una barreja de quatre rèpliques biològiques i la mitjana i la desviació estàndard s'obtenen a partir de tres rèpliques tècniques. Tal i com es pot veure a la Figura 13 (A) les línies de sobreexpressió NO 2, 5, 15 i 16 presenten una acumulació relativa de transcrit superior a la de les línies salvatges. Pel que fa a les línies de silenciament específic (NSE 43 i NSE 45) i conservat (NSC 1, NSC 31 i NSC 34), els nivells d'acumulació relativa de transcrit són clarament inferiors als de les salvatges.

Figura 13 Abundància Relativa de Transcrit (RTA) d'StNAC103 en les línies transformades respecte al gen constitutiu EF1 α . A) En les línies de sobreexpressió. B) En les línies de silenciament específic i conservat es mostra les mitjanes d'RTA i la desviació estàndard de les rèpliques tècniques. La mostra està composta per una barreja de 4 rèpliques biològiques.

A) Sobreexpressió



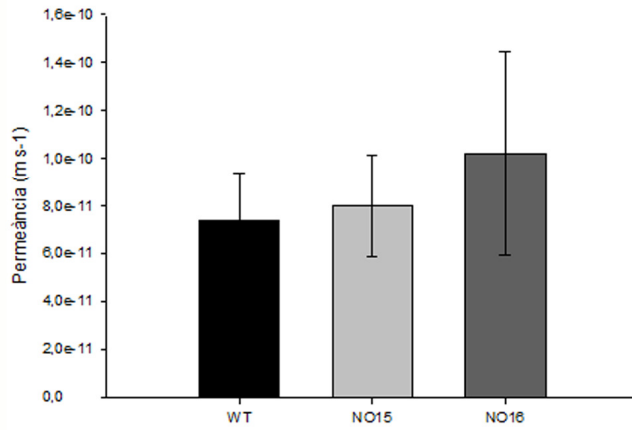
B) Silenciament



Efectes de la sobreexpressió d'*StNAC103* en la permeància del periderma

En les línies de sobreexpressió i les línies Désirée no transformades (control) es va analitzar la permeància hídrica dels peridermes de tubercle pel mètode gravimètric descrit anteriorment. Els resultats obtinguts (Figura 14, A) no permeten discernir diferències entre la permeància dels peridermes de les plantes salvatges i de les línies de sobreexpressió. Posteriorment a aquests anàlisis, el Sr. Andreu Quintana i Vehí (Quintana Vehí 2013) va analitzar la permeància hídrica de les línies silenciades respecte al control i en aquest cas tampoc es va trobar diferències significatives en comparació a la línia control.

A)



B)

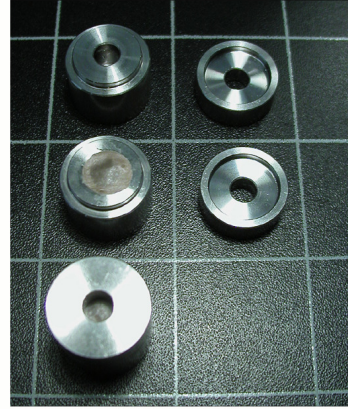


Figura 14 Permeància dels peridermes de les línies de sobreexpressió i control. A) Es representen les mitjanes de permeància en m s^{-1} i l'error estàndard de les línies de sobreexpressió 15 i 16 ($n_{\text{WT}}=4$, $n_{\text{NO15}}=3$, $n_{\text{NO16}}=2$). B) Muntatge d'una cambra de transpiració. Un volum de $300 \mu\text{l}$ d'aigua destil·lada es diposita en la cavitat de la cambra que s'observa al cilindre superior esquerre. El periderma es fixa amb l'ajuda de silicona (cilindre al mig, a l'esquerra). També es situa de forma que recobreixi tota la superfície efectiva de transpiració amb periderma lliure de lenticel·les i amb la cara externa mirant amunt. Finalment es clou la cambra amb la tapa (cilindres de la dreta) i es fixen per evitar-ne l'obertura accidental.

Efectes d'StNAC103 en el perfil de lípids del periderma

Efectes de la sobreexpressió

Es varen analitzar quatre línies de sobreexpressió (2, 5, 15, 16), per comparar-les amb controls cultivats en les mateixes condicions. Per a cada línia es varen analitzar les quantitats totals, la composició per classes de substàncies i la composició de cada substància o monòmer, tant de la suberina com de les ceres. Els resultats en conjunt, per a les línies de sobreexpressió i salvatge, es mostren a les figures 15 i 16. En relació a les ceres (Figura 15), no s'aprecien diferències estadísticament significatives (Annex I) en la quantitat total entre el conjunt de línies de sobreexpressió i control ($4,28 \pm 0,22 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ i $4,17 \pm 0,22 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$, respectivament), ni tampoc en les diferents classes de substàncies, o el perfil de les substàncies -excepte per a l'èster de C_{18} , que augmenta en les línies de sobreexpressió- (Figura 15). De la mateixa manera, no s'observen diferències en la suberina, ni en la quantitat total ($184,49 \pm 2,92 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el conjunt de línies de sobreexpressió i $180,20 \pm 3,37 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en la línia salvatge), ni en les classes de substàncies, ni en la composició monomèrica -excepte per a l'alcohol de C_{16} , que augmenta respecte a la salvatge- (Figura 16).

Podem concloure que la sobreexpressió d'StNAC103 no afecta de forma remarcable ni a la càrrega ni al perfil de lípids de ceres i suberina.

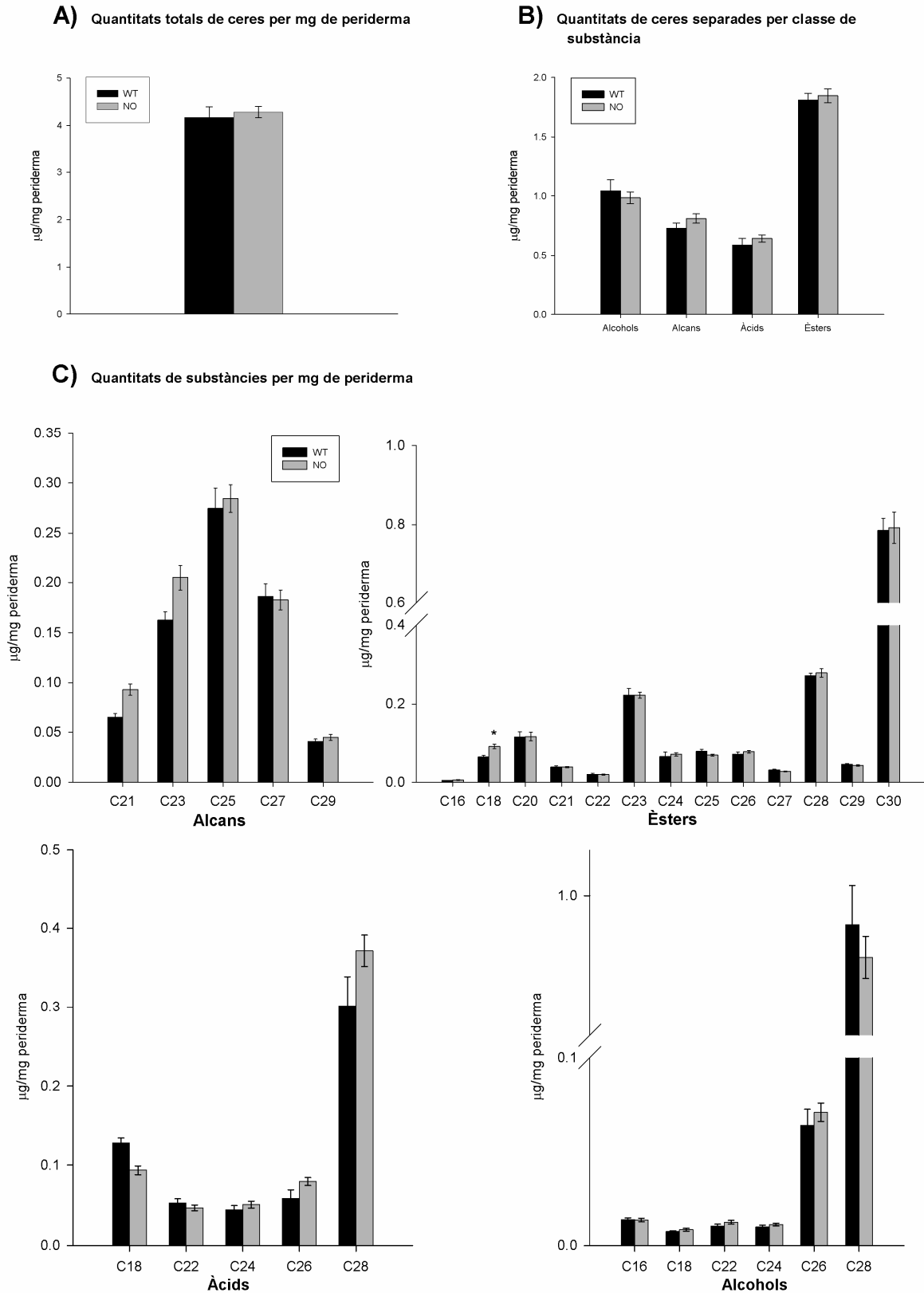


Figura 15 Efectes de la sobreexpressió d'StNAC103 en el perfil lipídic de ceres del periderma. Es representa la mitjana i l'error estàndard de la quantitat total de ceres, de la quantitat de cada tipus de substàncies i quantitat de les diferents substàncies. Les línies que es van utilitzar són les línies de sobreexpressió 2, 5, 15 i 16 i la salvatge ($n_{WT}=5$, NO: $n_{NO2}=2$, $n_{NO5}=3$, $n_{NO15}=4$, $n_{NO16}=4$). Les diferències significatives ($p<0,05$) s'indiquen amb un asterisc (*) (Annex I).

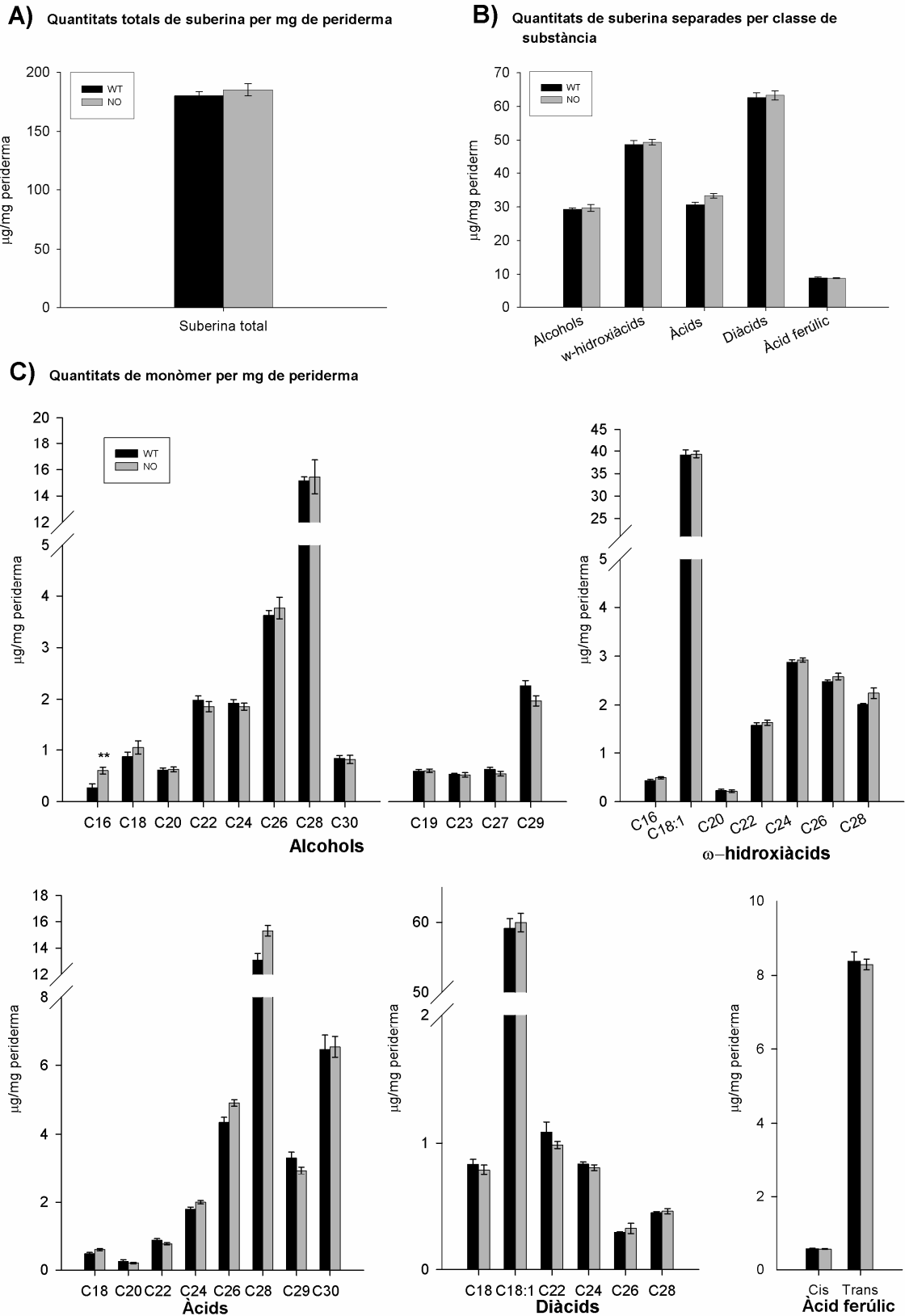


Figura 16 Efectes de la sobreexpressió d'StNAC103 en el perfil lipídic de la suberina del periderma. Es representa la mitjana i l'error estàndard de la quantitat total de suberina, de la quantitat de cada tipus de substància i de cada diferent compost. Les línies que es van utilitzar són les línies de sobreexpressió 2, 5, 15 i 16 i la salvatge ($n_{WT}=5$, NO: $n_{NO2}=1$, $n_{NO5}=3$, $n_{NO15}=4$, $n_{NO16}=4$). Les diferències molt significatives ($p<0,001$) s'indiquen amb dos asteriscs (**). (Annex I).

Efectes del silenciament

S'ha analitzat dues línies de silenciament específic (43, 45) i tres línies de silenciament conservat (1, 31, 34) en comparació amb la línia salvatge Desirée, cultivada en les mateixes condicions. Es va analitzar la quantitat total, la distribució per classes de substàncies i la composició química de suberina i ceres respectivament. A diferència de la sobreexpressió, l'anàlisi de les línies silenciades revela un efecte en el fenotip per silenciament específic i conservat tant en suberina com en ceres.

- Efectes del silenciament (específic i conservat) a les ceres

En relació al **silenciament específic** s'observa que la quantitat total de lípids (que correspon a la suma de la càrrega total de ceres i suberina) es veu augmentada respecte a la línia control (Figura 17, A). Quan s'analitza la quantitat de ceres s'observa una tendència a l'augment -un 30 %- en les línies silenciades respecte al control (WT) (Figura 17, B). Quan es compara la composició relativa de les diferents classes de substància s'evidencia que els alcans passen de representar un 17 % en les plantes salvatges a un 33 % en el silenciament específic, que representa gairebé doblar la proporció d'alcans en les ceres (Figura 17, C). Pel que fa a la classe de substàncies, s'observa que la quantitat d'alcans augmenta de forma molt significativa (Annex I) en les línies de silenciament específic (Figura 17, D). En referència a la composició química dels alcans destaca l'afectació en les substàncies de C₂₃, C₂₅ i C₂₇ i també s'observa una tendència a l'augment en els alcans de C₂₁ i C₂₉, que presenten un increment de més del doble en el silenciament específic respecte a la línia salvatge (Figura 18). L'augment més important correspon al C₂₃ alcà, que triplica la quantitat respecte la salvatge i el més baix el del C₂₇, que gairebé la duplica.

Pel que fa als èsters, tot i que no s'observen variacions en la quantitat total, disminueixen els de C₁₈, C₂₀ i C₂₂ en les línies silenciades de forma específica respecte a les control (Figura 18). Quan s'observen dos esdeveniments independents de transformació que donen lloc al silenciament específic (NSE 43 i NSE 45), s'observa que respecte a la línia salvatge hi ha una acumulació clara en tots els alcans, mentre que pel que fa als èsters les diferències són evidents en els dos casos per als de C₁₈ i C₂₀ (Figura 19). Per a les altres classes de substàncies no s'observen diferències remarcables en comparació amb el control, ni en relació a la quantitat total de la substància ni en relació al perfil lipídic de cada classe de substància.

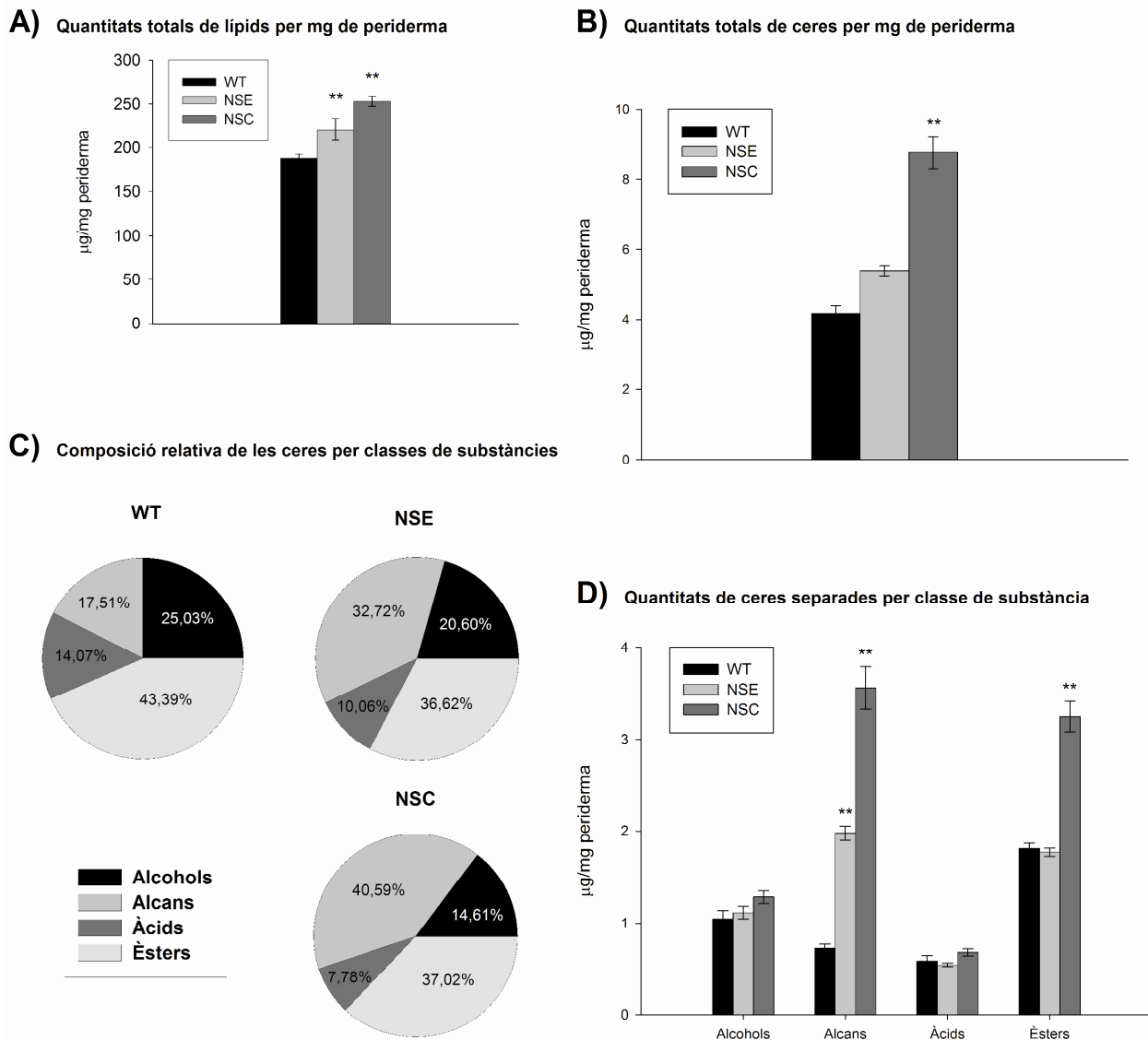
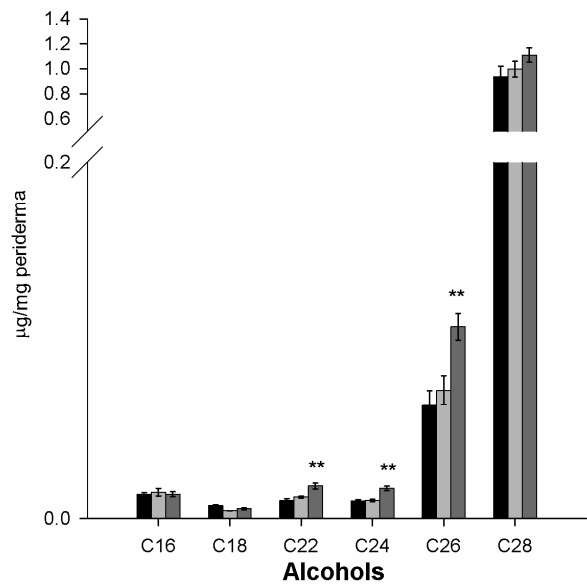
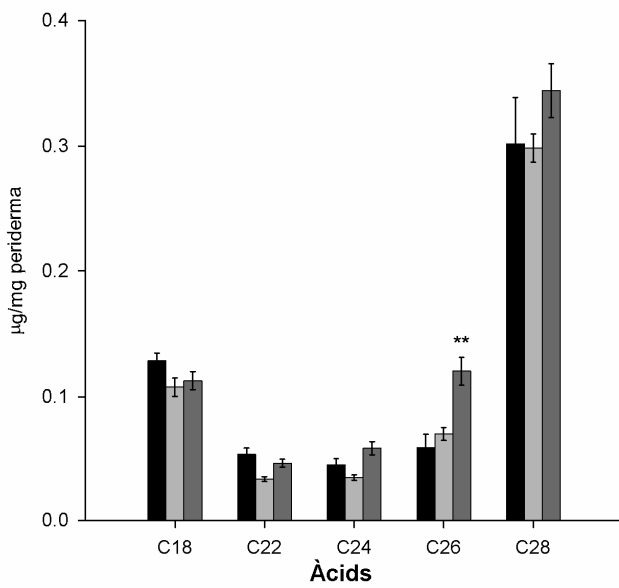
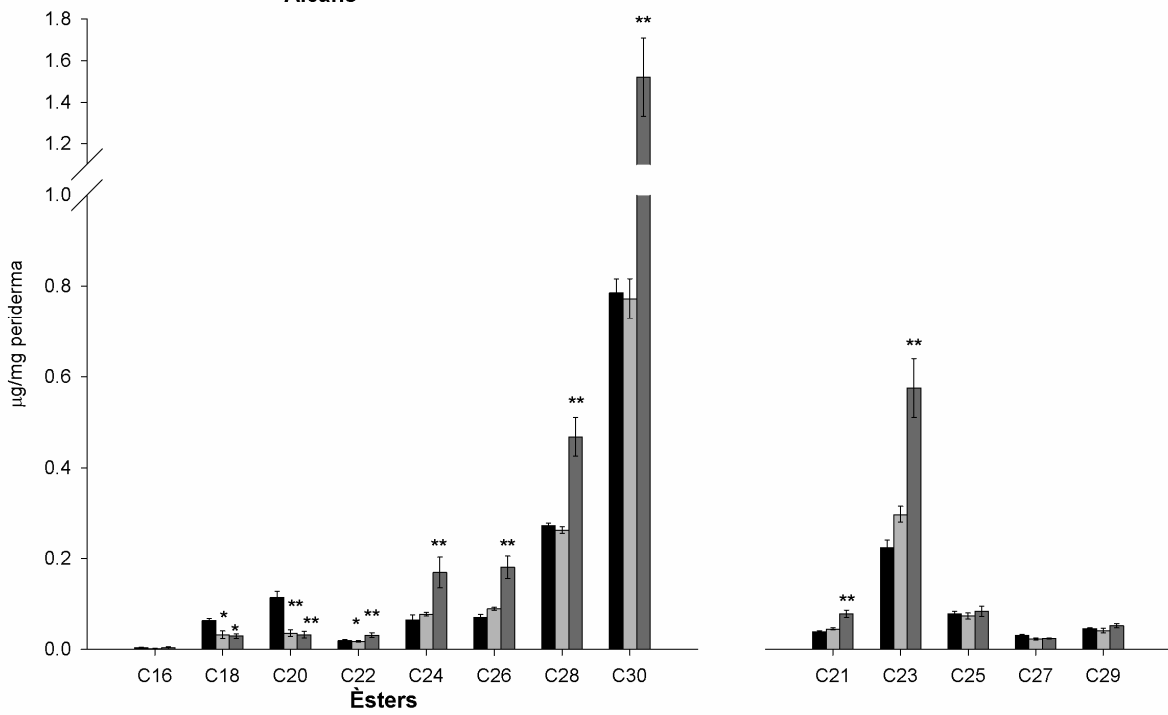
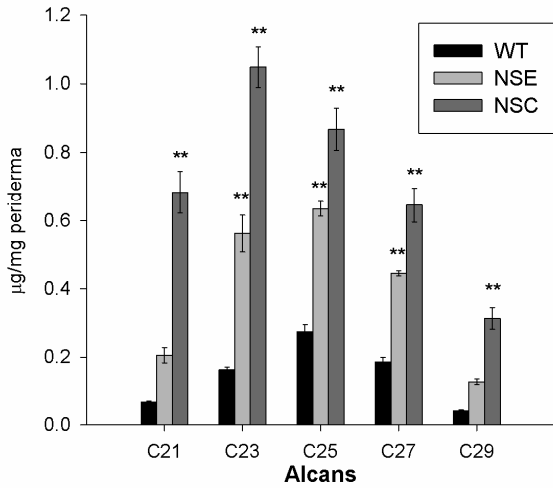


Figura 17 Efectes del silenciament d'StNAC103 en la càrrega total de lípids i les classes de substàncies de les ceres. Es representa la mitjana i l'error estàndard de quantitat total de ceres i quantitat de cada classe de substància. Les línies que es van utilitzar són les línies de silenciament específic (43 i 45), del conservat (1, 31 i 34) i línies salvatges ($n_{WT}=5$; NSE: $n_{NSE43}=4$ $n_{NSE45}=3$ i NSC: $n_{NSC1}=4$, $n_{NSC31}=4$, $n_{NSC34}=4$). Les diferències significatives Post Hoc ($p<0,05$) s'indiquen amb un asterisc (*) i les molt significatives ($p<0,001$) amb dos asteriscs (**). (Annex I).

Figura 18 Efectes del silenciament d'StNAC103 en el perfil lipídic de ceres del periderma. Es representa la mitjana i error estàndard de cada component identificat en les ceres. Les línies que es van utilitzar en aquest anàlisi són les línies de silenciament específic 43 i 45, del conservat, 1, 31 i 34 i línies salvatges ($n_{WT}=5$, NSE: $n_{NSE43}=4$ $n_{NSE45}=3$ i NSC: $n_{NSC1}=4$, $n_{NSC31}=4$, $n_{NSC34}=4$). Les diferències significatives Post Hoc ($p<0,05$) s'indiquen amb un asterisc (*) i les molt significatives ($p<0,001$) amb dos asteriscs (**). Per a aquest anàlisi, s'ha dut a terme ANOVA per a tots els casos excepte les substàncies alcans del C₂₅ al C₂₉ del silenciament específic i els alcohols del silenciament conservat C₁₈, C₂₂ i C₂₆, per als quals s'ha dut a terme una prova de Kruskal-Wallis (Annex I).



En relació al **silenciament conservat** s'observa un efecte en el mateix sentit que el silenciament específic, però més marcat. En concret s'observa un increment de de la quantitat total de ceres, de $4,17 \pm 0,22 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ del control a $8,76 \pm 0,46 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el silenciament conservat (Figura 17, B). Quan es representa el percentatge de les diferents classes de substància s'observa que la proporció d'alcans augmenta més del doble en el silenciament conservat respecte al control (40,59 % respecte al 17,51 %), mentre que la proporció de la resta de classes de substàncies disminueixen. Pel que fa a la comparació del silenciament conservat respecte a l'específic, s'observa un increment en la proporció dels alcans en el primer (Figura 17, C). Pel que fa a les classes de substàncies, quan es representen per $\mu\text{g mg de periderma}^{-1}$, s'observa en el silenciament conservat un augment estadísticament significatiu (Annex I) dels alcans i dels èsters (Figura 17, D). Quan s'analitza la quantitat de cada alcà (Figura 18) s'observa que tots els alcans augmenten entre 3 i 11 vegades, amb la diferència més notable la de l'alcà de C_{21} (10,4 vegades). En relació a la quantitat total dels èsters s'observa que el silenciament conservat en conté 1,79 vegades més respecte les plantes control (Figura 17, D), i concretament augmenten els èsters de C_{21} a C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} , mentre que es dona una disminució en els èsters de C_{18} i C_{20} (Figura 18). Es tracta doncs, de l'accentuació del fenotip que s'ha observat en les plantes amb silenciament específic. A més del descrit, és interessant observar que si bé els alcohols no varien de manera significativa (Annex I) en el seu conjunt respecte les plantes salvatges (Figura 17, D), sí que hi ha un increment específic dels alcohols de C_{22} , C_{24} i C_{26} (Figura 18). Pel que fa als àcids, val la pena remarcar que s'observa un augment significatiu (Annex I) del de C_{26} . En la Figura 20 es representa la composició química de les ceres de tres esdeveniments independents de transformació de la construcció de silenciament conservat respecte a la línia control. Tal i com es pot veure en aquesta figura, els efectes a nivell d'alcans, èsters, alcohols i àcids citats anteriorment també són evidents en els tres esdeveniments independents de transformació respecte al control.

Línies NSE

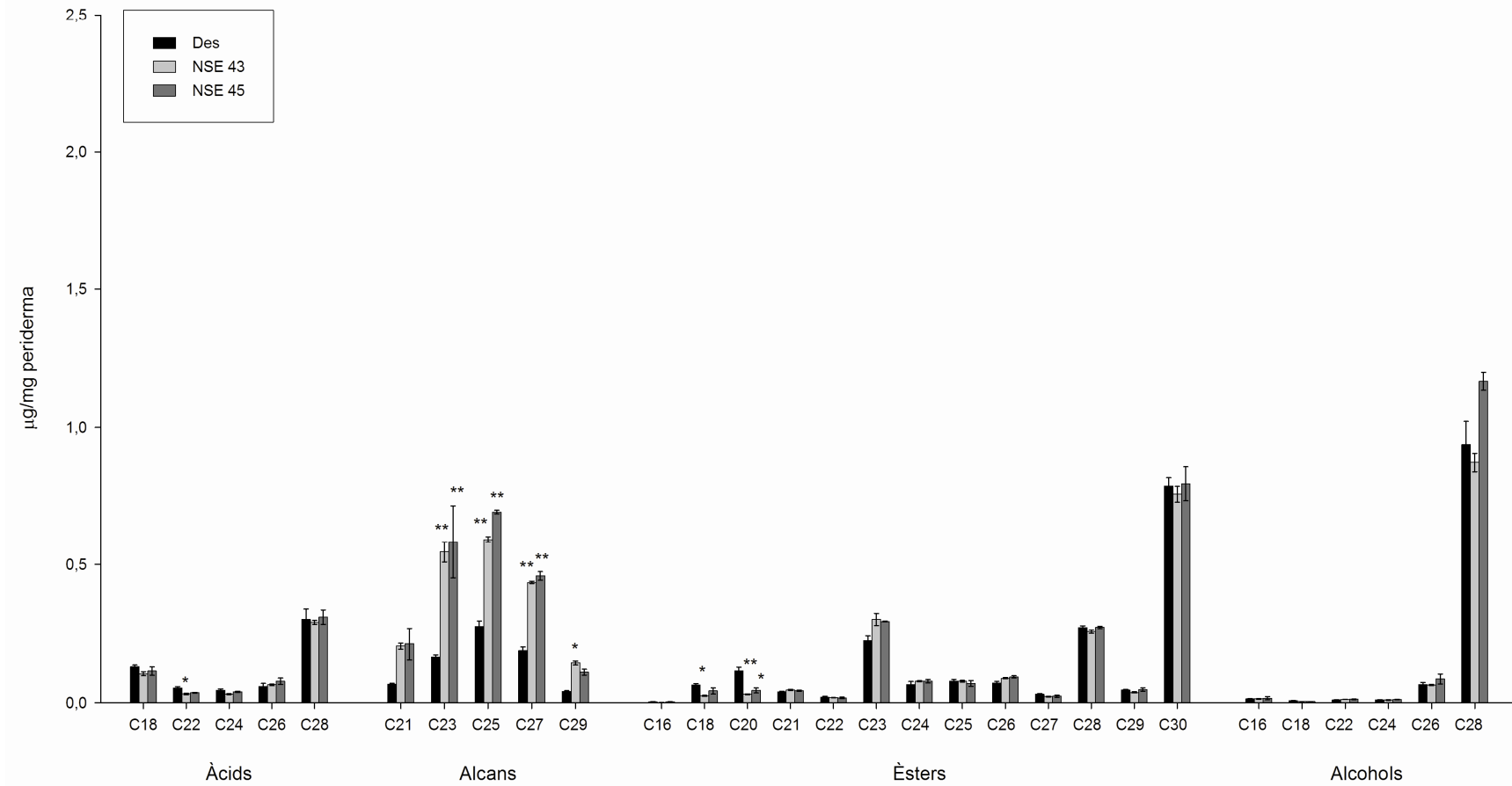


Figura 19 Efectes del silenciament específic d'StNAC103 en el perfil lipídic de ceres del periderma. Es representen les mitjanes i l'error estàndard de la quantitat de les diferents substàncies de les ceres per les línies de silenciament específic 43 (n=4) i 45 (n=3) i la salvatge (n=5) (Annex I).

Línies NSC

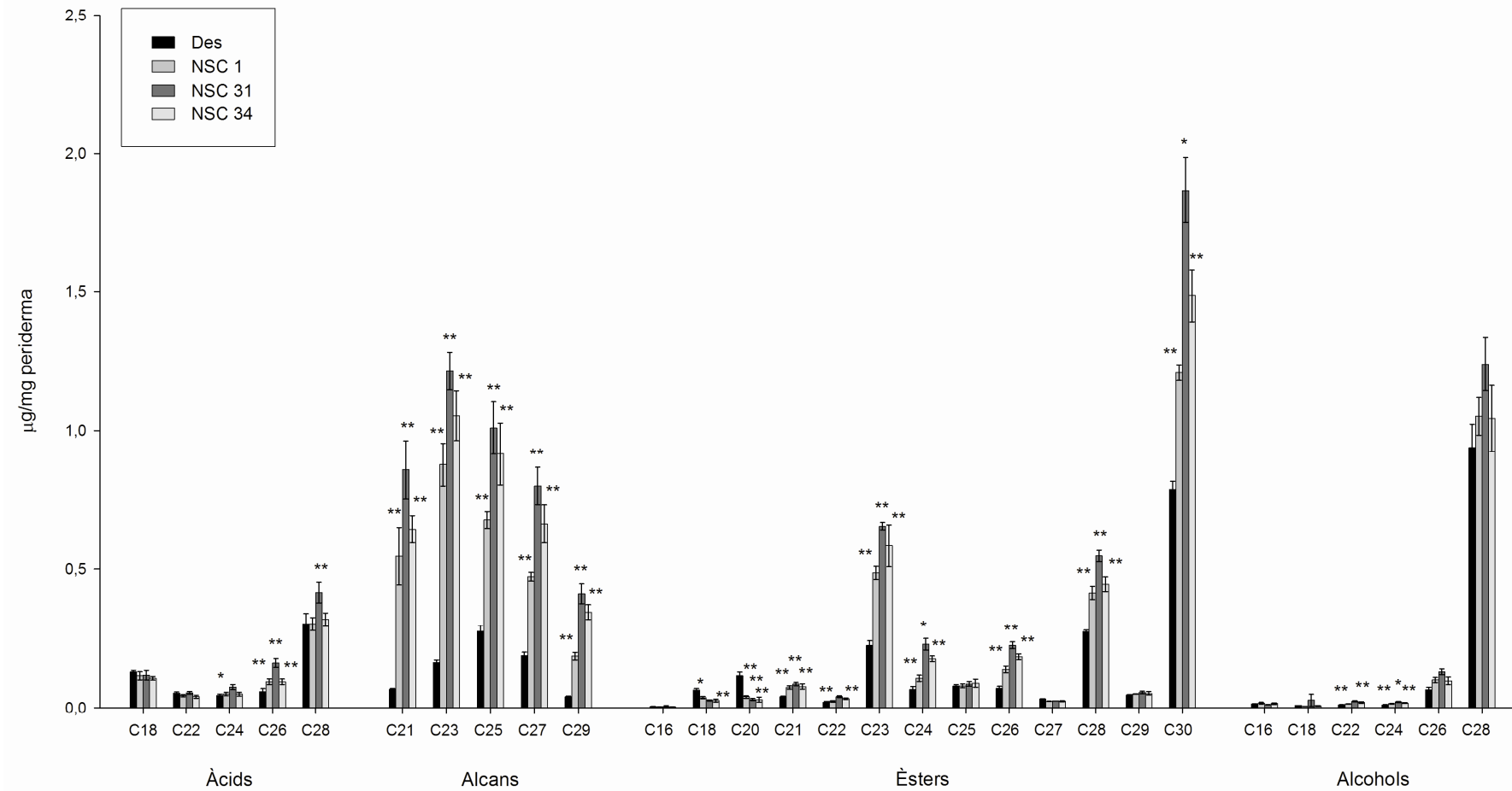


Figura 20 Efectes del silenciament conservat d'StNAC103 en el perfil lipídic de ceres del periderma. Es representen les mitjanes i l'error estàndard de la quantitat de les diferents substàncies de les ceres per les línies de silenciament conservat 1(n=4), 31 (n=4) i 34 (n=4) i la salvatge (n=5) (Annex I).

- Efectes del silenciament (específic i conservat) a la suberina

En relació a la suberina, en el cas del **silenciament específic** s'observa un augment en la quantitat total, de $180,20 \pm 3,37 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ que conté el control a $223,05 \pm 4,21 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el silenciament (Figura 21, A). L'augment del total és degut a l'increment de la quantitat d'alcohols (que passen a quantificar 1,54 vegades el valor del control), d' ω -hidroxiàcids (1,22 vegades), diàcids (1,23) i del ferulat (1,24 vegades), i s'observa una tendència a l'augment en els diàcids (Figura 21, B). En referència als monòmers (Figura 21, C), dintre de la classe alcohols, el major augment quantitativament, és el de l'alcohol de C_{28} , que augmenta de $15,32 \pm 0,30 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en plantes salvatges, a $27,60 \pm 0,98 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en plantes de silenciament específic i explica la major part de l'augment dels alcohols. El de C_{26} , augmenta de $3,58 \pm 0,10 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$, a $5,78 \pm 0,11 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$. Pel que fa a les proporcions, el major augment el protagonitzen els de C_{26} , C_{28} i C_{30} (1,61 a 1,84 vegades els valors del control). En segon lloc, els de C_{19} i C_{24} augmenten fins a una quantitat d'1,49 i 1,27 vegades respectivament.

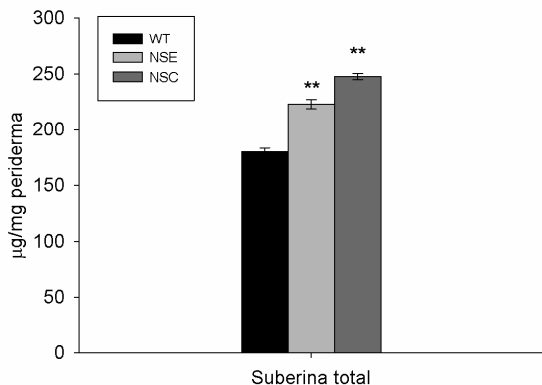
Pel que fa als ω -hidroxiàcids, l'augment principal i que explica la major part de l'increment dels ω -hidroxiàcids, quantitativament es dona en el de $C_{18:1}$, que augmenta de $39,12 \pm 1,14 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en plantes salvatges, a $46,51 \pm 0,94 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el silenciament específic. En segon lloc, el de C_{28} augmenta de $2,01 \pm 0,01 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$, a $3,97 \pm 0,09 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$. En referència a les proporcions, els augments per ordre d'importància, es donen en els ω -hidroxiàcids de C_{20} (2,68 vegades la quantitat present en el control) i C_{28} (1,97 vegades), seguits dels de $C_{18:1}$ (1,19 vegades) i C_{26} (1,29 vegades). Pel que fa als diàcids, el de $C_{18:1}$ torna a ser el tipus de cadena que explica la major part de l'augment quantitatiu, i passa de $59,13 \pm 1,39 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en plantes salvatges, a $73,16 \pm 1,88 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el silenciament específic. En referència a les proporcions dels diàcids, el de C_{28} arriba a una quantitat d'1,66 vegades la del control, 1,33 vegades el de C_{18} i 1,24 el de $C_{18:1}$. En referència als àcids: el de C_{20} arriba a 1,79 vegades respecte el control i el de C_{22} , 1,52 vegades. La resta de monòmers es mantenen sense canvis significatius (Annex I), excepte el de C_{24} , que disminueix. Quan es representen dos esdeveniments independents de transformació del silenciament específic respecte a la línia salvatge (Figura 22), són evidents els efectes a nivell d'augment d'alcohols de C_{19} , C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} , ω -hidroxiàcids de $C_{18:1}$, C_{20} i C_{28} , els diàcids de C_{18} , $C_{18:1}$ i C_{28} , l'àcid de C_{22} i el transferúlic.

El **silenciament conservat** mostra les mateixes tendències que l'específic pel que fa a la suberina però amb els efectes més acusats. La quantitat total de suberina és $247,84 \pm 2,71 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$ en el silenciament conservat mentre que en la línia control és $180,20 \pm 3,37 \mu\text{g mg}^{-1}$ (Figura 21, A). La diferència entre el silenciament conservat i el control és doncs més acusada que la que s'observa entre el silenciament específic i el control. Quan s'analitzen els efectes del silenciament conservat en les classes de monòmers s'observa que hi ha un augment d'alcohols (1,63 vegades la quantitat del control), ω -

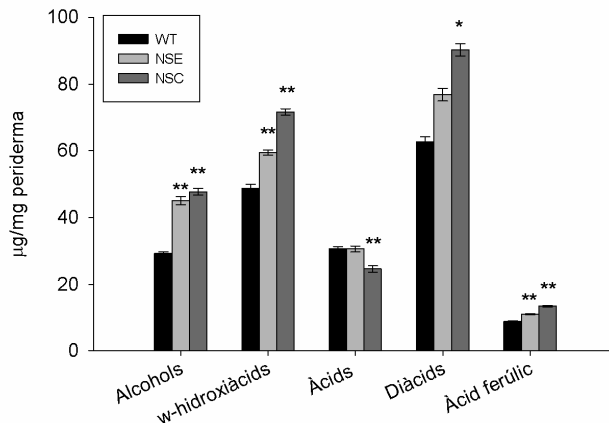
hidroxiàcids (1,47 vegades), diàcids (0,87 vegades) i àcid ferúlic (1,50 vegades), mentre que hi ha una disminució significativa en els àcids (0,80 vegades; i Figura 21, B). La composició química dels alcohols en el silenciament conservat mostra un augment de C_{19} i les cadenes parells de C_{24} i superiors (els valors van d'1,31 a 2,28 vegades les quantitats presents en el control), mentre que els alcohols de C_{18} i C_{23} mostren una disminució significativa (Figura 21, C i annex I). A nivell global, en el perfil lipídic dels alcohols es veu un efecte més acusat en el silenciament conservat que en l'específic. En referència als ω -hidroxiàcids (Figura 21, C), s'observa un increment de $C_{18:1}$, C_{20} , C_{26} i C_{28} (d'1,22 a 2,18 vegades la quantitat en el control). És remarcable l'augment de $C_{18:1}$, que arriba a una quantitat de $58,64 \pm 1,014 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$. Pel que fa als diàcids (Figura 21, C), augmenta la quantitat de $C_{18:1}$ (esdevé 1,48 vegades el control) i C_{28} (1,42 vegades) mentre que els de C_{22} i C_{24} disminueixen de 0,62 a 0,69 vegades respecte el control. Altre cop cal esmentar l'increment de $C_{18:1}$, que es presenta en $87,25 \pm 1,85 \mu\text{g mg de periderma}^{-1}$.

En els àcids (Figura 21, C) observem un augment del de C_{22} i una disminució estadísticament significativa de C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{29} (es quantifiquen de 0,73 a 0,80 vegades el control). En general es pot dir també amb els àcids, que els efectes observats amb el silenciament específic s'acusen en el silenciament conservat. Pel que fa al ferulat, totes dues formes augmenten fins a representar aproximadament 1,50 vegades la quantitat present en el control, i cal parlar esment que també es tracta d'un increment notable respecte el silenciament específic. Quan es representen tres esdeveniments independents de transformació respecte a la línia salvatge (Figura 23) s'observa que hi ha diferències clares pel que fa als alcohols de C_{18} , C_{19} , C_{24} , C_{26} , C_{28} i C_{30} ; ω -hidroxiàcids de $C_{18:1}$, C_{20} , C_{26} i C_{28} ; diàcids de $C_{18:1}$, C_{24} i C_{28} ; àcids de C_{22} , C_{24} , C_{26} , i C_{28} i el transferúlic. En la Figura 21 (C) s'observa que l'afectació deguda al silenciament es dona sobretot a $C_{18:1}$ i als àcids grassos de cadena molt llarga, tant en les línies amb silenciament conservat com amb silenciament específic. Es dona una alteració significativa (Annex I) en totes les classes de substància i s'observa un augment en alcohols i ω -hidroxiàcids, així com una disminució en àcids. Altre cop en aquesta figura, s'observa que el silenciament conservat dona com a resultat un fenotip més acusat que el silenciament específic.

A) Quantitats totals de suberina per mg de periderma



B) Quantitats de suberina separades per classe de substància



C) Quantitats de monòmer per mg de periderma

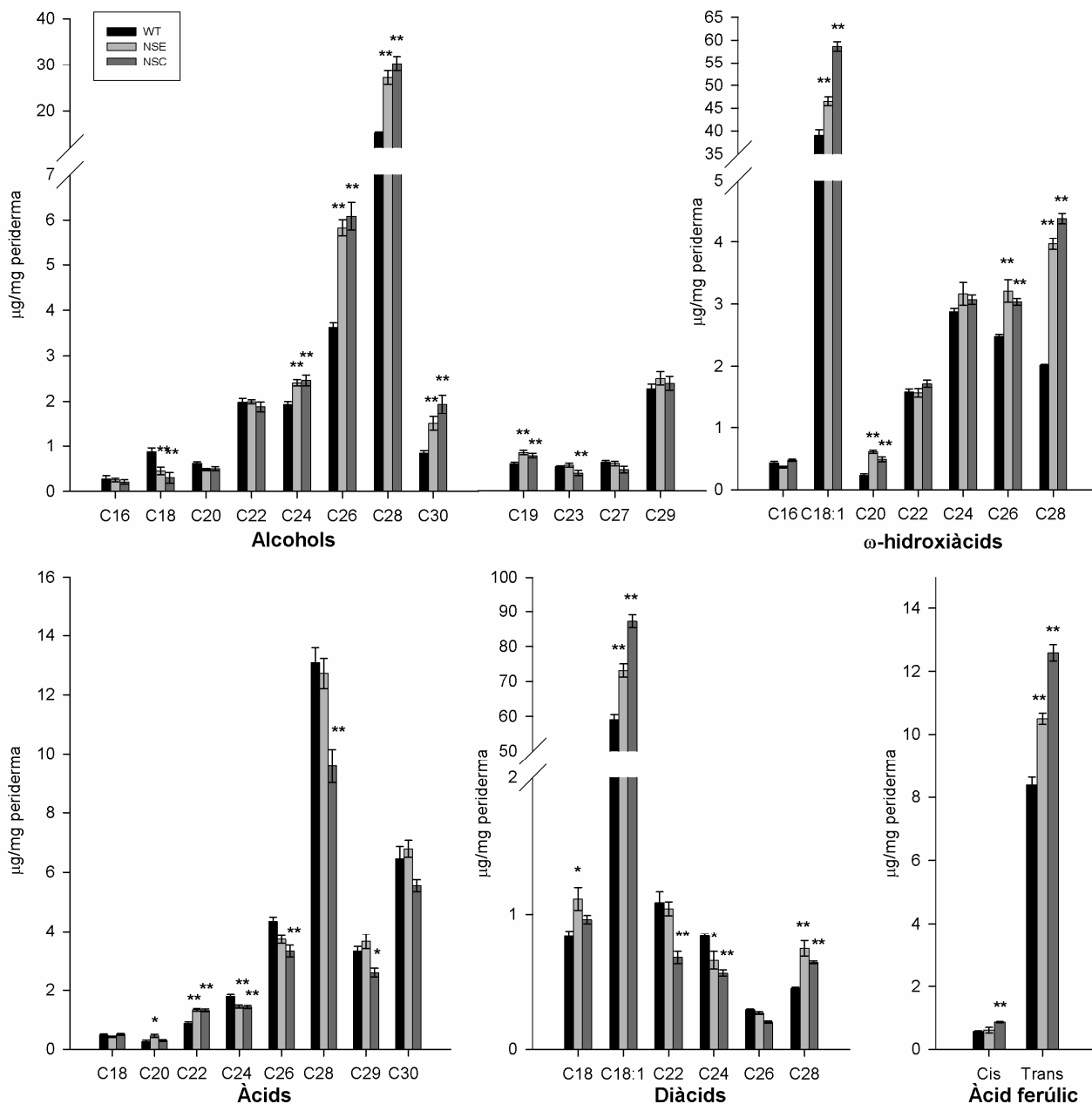


Figura 21 Efectes del silenciament d'StNAC103 en el perfil lipídic de la suberina del periderma. Es representa la mitjana i error estàndard de la quantitat total de suberina, de cada classe de substància i de cada monòmer identificat en la suberina. Les línies que es van utilitzar són les línies de silenciament específic (43 i 45), les del conservat (1, 31 i 34) i línies salvatges ($n_{WT}=5$, NSE: $n_{NSE43}=4$ $n_{NSE45}=3$ i NSC: $n_{NSC1}=4$, $n_{NSC31}=4$, $n_{NSC34}=4$). Les diferències significatives Post Hoc ($p<0,05$) s'indiquen amb un asterisc (*) i les molt significatives ($p<0,001$) amb dos asteriscs (**). S'ha dut a terme ANOVA per a tots els casos excepte els monòmers d'alcohol de C_{30} i d' ω -hidroxiàcid de C_{20} i C_{28} del silenciament específic, i els d'alcohol de C_{27} i de diàcid de C_{26} del silenciament conservat, per als quals s'ha dut a terme una prova de Kruskal-Wallis (Annex I).

Podem concloure que el silenciament d'StNAC103 afecta el perfil de lípids del periderma: n'augmenta la càrrega total de suberina i ceres. Pel que fa a les ceres, hi ha sobretot un enriquiment en els productes derivats de la via de biosíntesi dels alcans, però també es veu afectació en èsters, alcohols i àcids i aquest efecte és molt evident en VLCFA parells (Figura 24). Pel que fa a la suberina (Figura 25) queda enriquida amb productes de final de via, derivats de l'elongació de VLCFA i modificació d'àcids grassos com són els alcohols i els ω -hidroxiàcids. Tant el **silenciament específic com el conservat**, tenen la mateixa tendència. El fet que el silenciament conservat tingui un efecte més acusat que l'específic suggereix que hi ha altres membres del grup NAC de factors de transcripció al periderma que actuen de manera redundat o cooperativa.

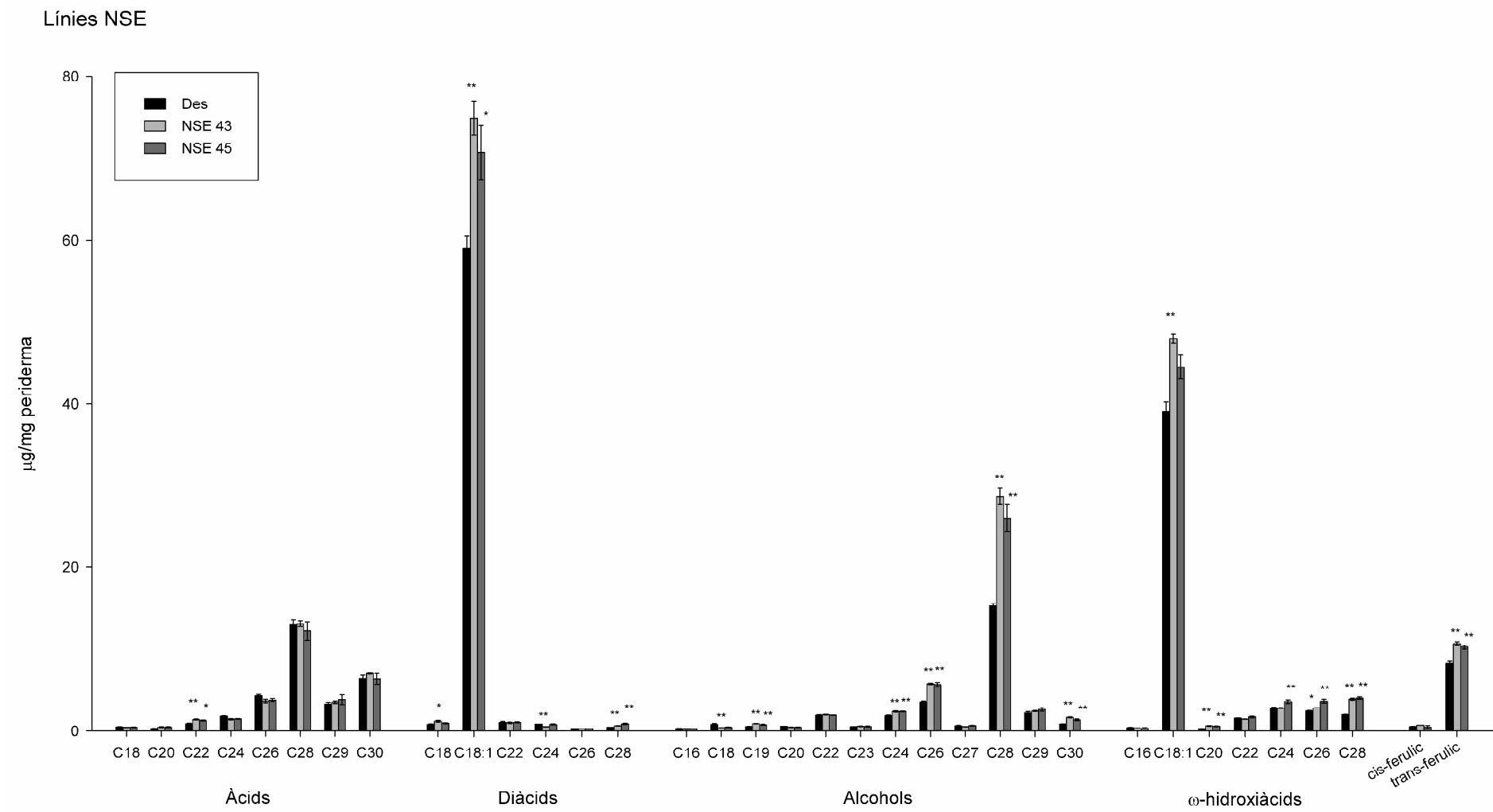


Figura 22 Efectes del silenciament específic d'StNAC103 en el perfil lipídic de suberina del periderma. Es representen les mitjanes i l'error estàndard de la quantitat dels diferents monòmers de la suberina de les línies de silenciament específic 43(n=4) i 45 (n=3) i la línia salvatge (n=5) (Annex I).

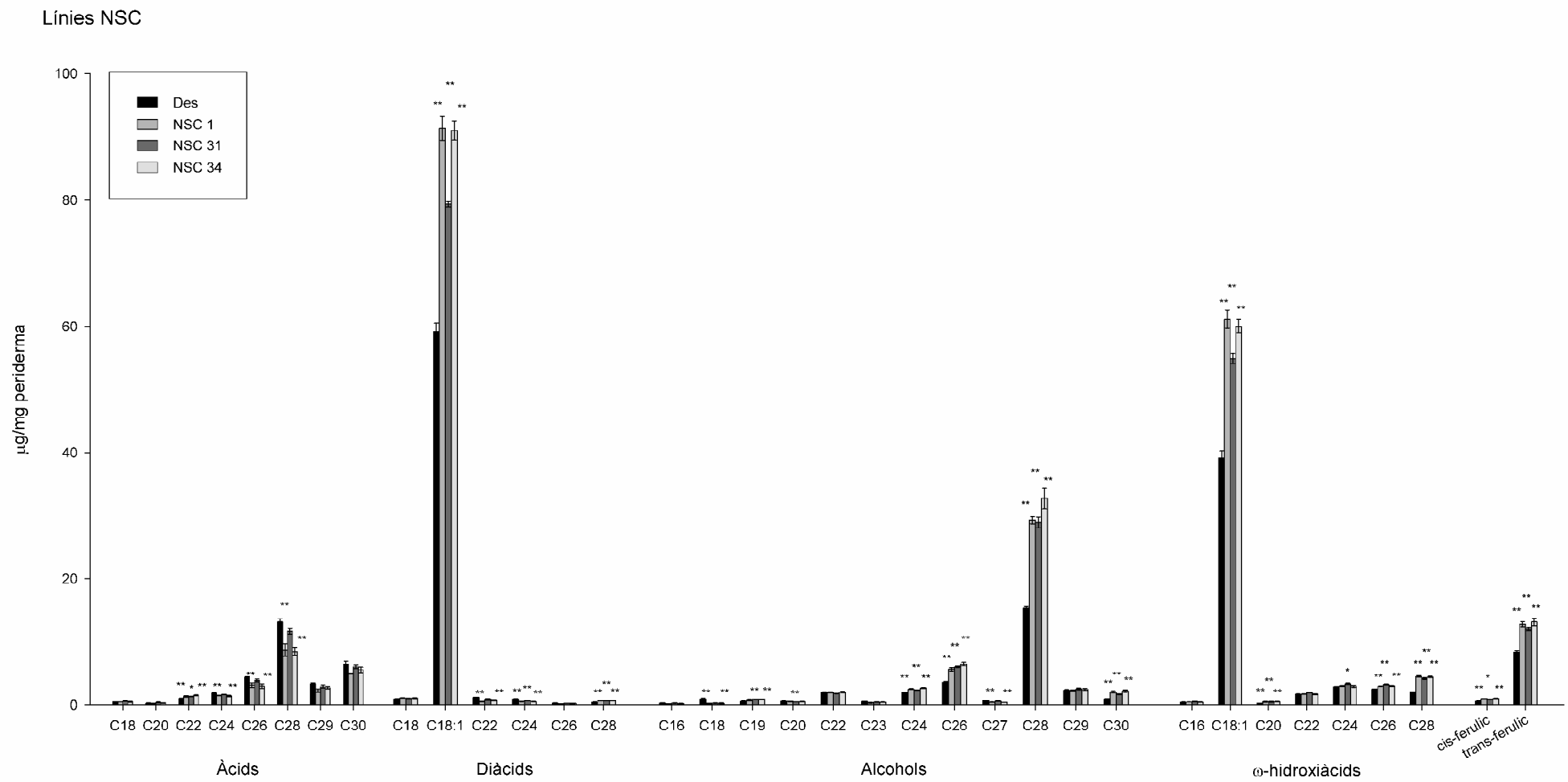


Figura 23 Efectes del silenciament conservat d'StNAC103 en el perfil lipídic de suberina del periderma. Es representen les mitjanes i l'error estàndard de la quantitat dels diferents monòmers de la suberina de les línies de silenciament conservat 1 (n=4), 31 (n=4) i 34 (n=4) i la línia salvatge (n=5) (Annex I).

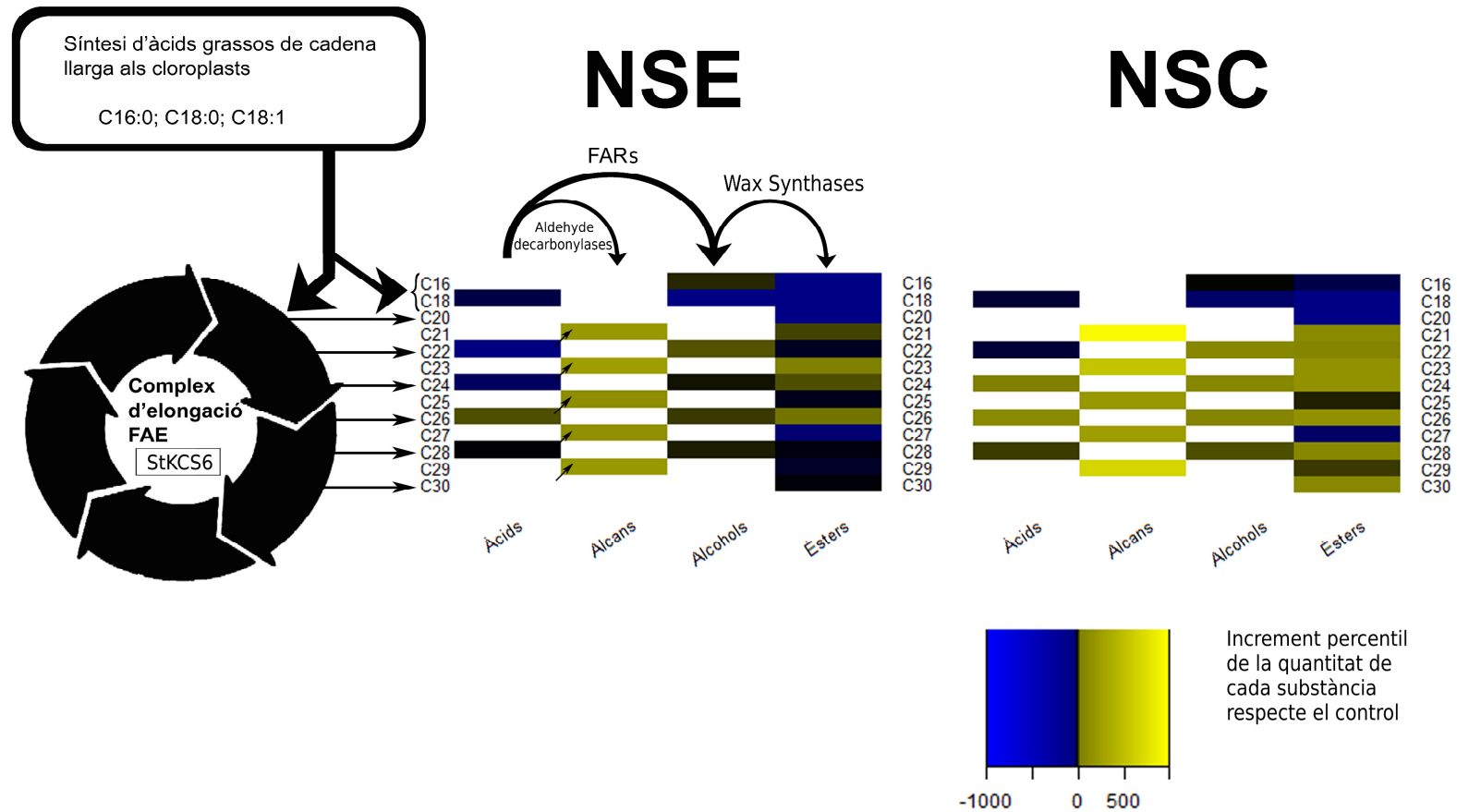


Figura 24 Increment en percentatge de la quantitat de cada substància de les ceres en les plantes silenciades, respecte el control. Es mostra un esquema per il·lustrar la direcció dels processos de biosíntesi de substàncies de les ceres- segons el que es coneix actualment-, solapat a un mapa d'intensitat. Les fletxes indiquen el curs possible per als metabòlits. En el cas dels alcans, a més, especifiquen que poden provenir d'un àcid amb un carboni més a través de l'acció de les aldehyd decarboxilases. El mapa d'intensitat mostra l'augment o decrement de cada monòmer respecte el control. La intensitat del color representa el percentil tal com figura a la llegenda. En requadres hi figuren només alguns dels enzims que podrien estar implicats en les funcions d'elongació i modificació d'àcids grassos. Les cel·les de color blanc corresponen a substàncies no identificades en l'anàlisi duta a terme.

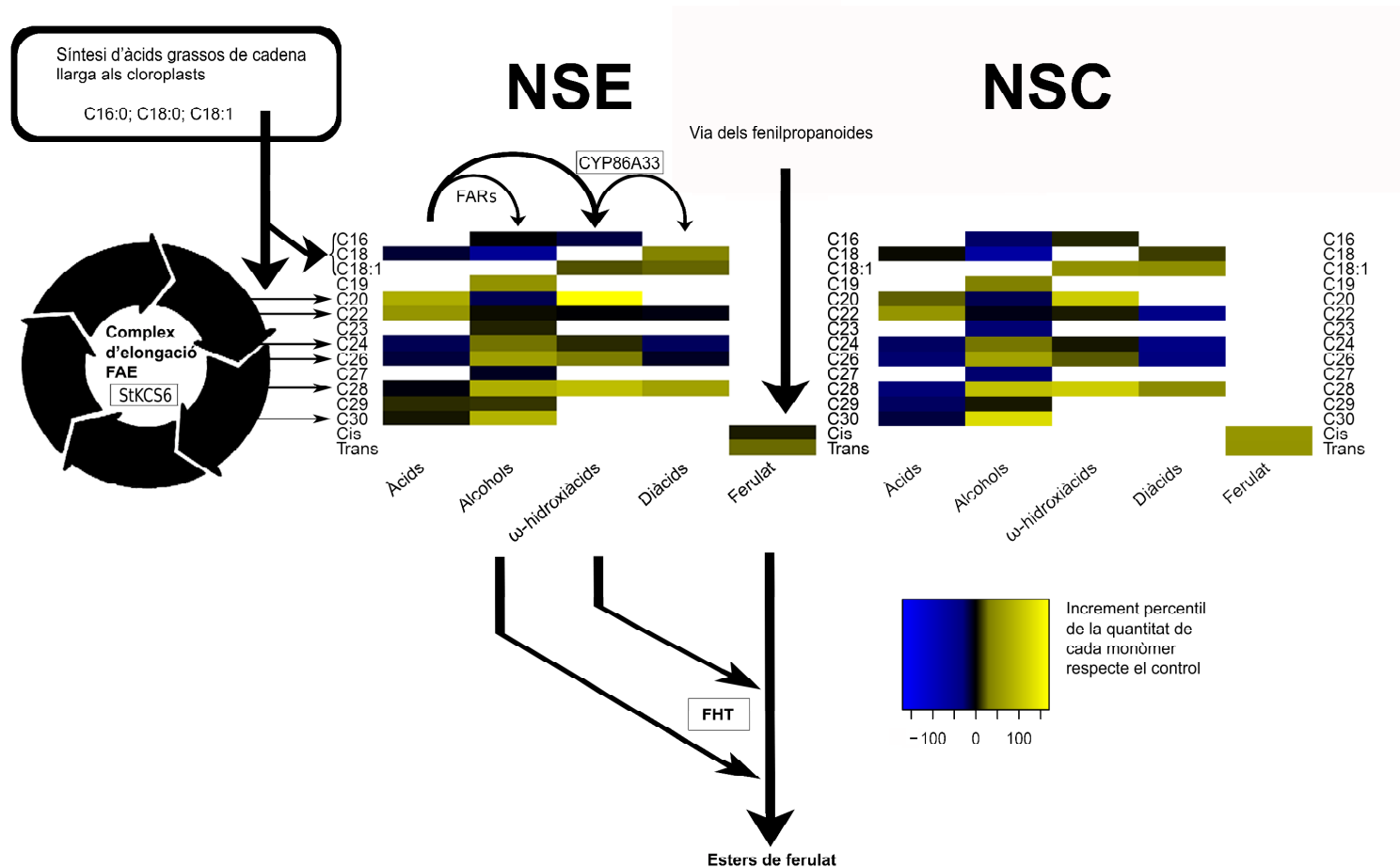


Figura 25 Increment en percentatge de la quantitat de cada monòmer de suberina en les plantes silenciades, respecte el control. Es mostra un esquema per il·lustrar la direcció dels processos de biosíntesi de monòmers de suberina -segons el que es coneix actualment-, solapat a un mapa d'intensitat. Les fletxes indiquen el curs possible per als metabòlits. El mapa d'intensitat mostra l'augment o decrement de cada monòmer respecte el control. La intensitat del color representa el percentil tal com figura a la llegenda. En requadres hi figuren només alguns dels enzims que podrien estar implicats en les funcions d'elongació i modificació d'ácids grassos. Les cel·les de color blanc corresponen a substàncies no identificades en l'anàlisi duta a terme.

Efectes del silenciament d'*StNAC103* en l'anatomia microscòpica i l'ultraestructura del periderma

A nivell global, i de manera macroscòpica, no es va observar cap diferència de fenotip en plantes silenciades respecte les control. De la mateixa manera, l'observació anatòmica del periderma mitjançant microscòpia òptica no va revelar diferències en l'organització del periderma ni el nombre de capes de cèl·lules que la conformen, en plantes de silenciament conservat respecte a les salvatges. Finalment es va dur a terme una preparació per a TEM per tal d'observar l'ultraestructura de la paret cel·lular (Figura 26). En aquesta microfotografia es va poder observar la disposició lamel·lar típica de la suberina, tant en les línies de silenciament conservat com en la línia salvatge, i un gruix de lamel·les similars en tots dos casos. Pel que fa al nombre de capes, es va comprovar que hi ha una certa variabilitat en el nombre de lamel·les, que de forma natural varia en diferents cèl·lules d'una mateixa preparació. En tot cas, no es va observar diferències en l'organització de la capa de suberina entre les plantes silenciades i les control.

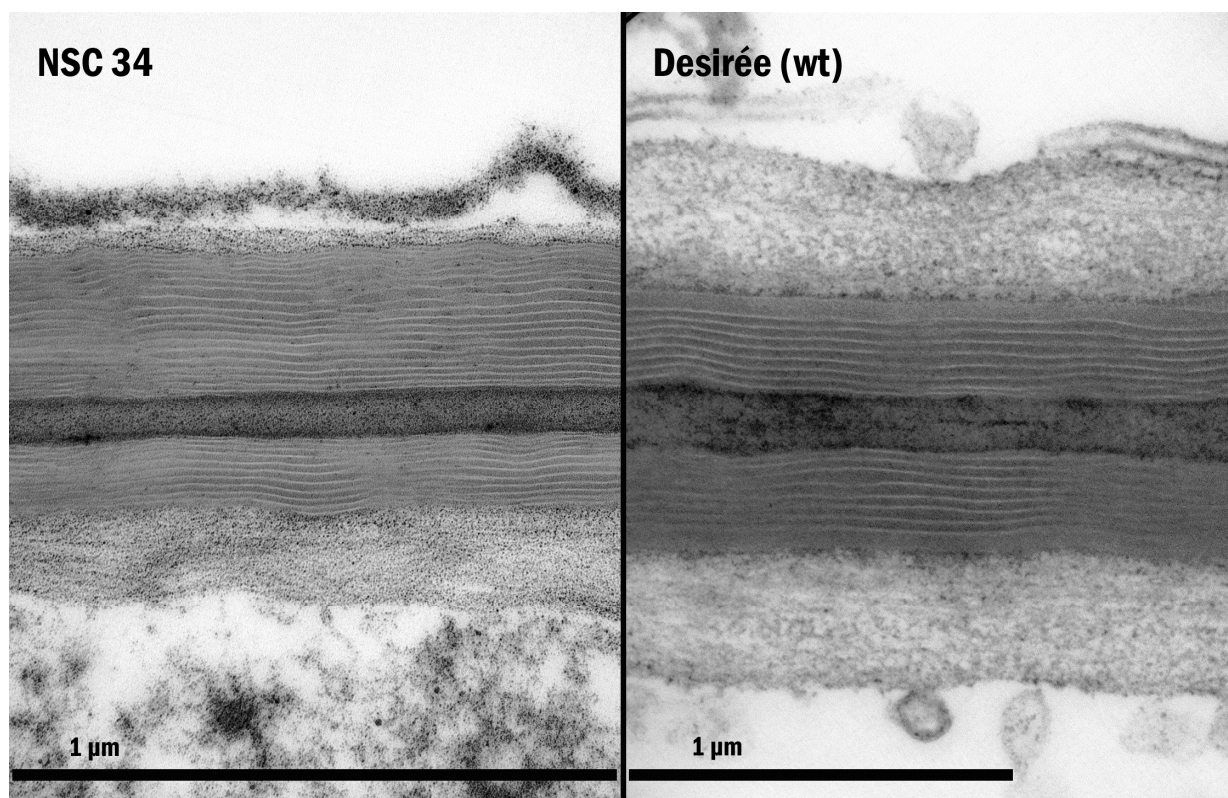


Figura 26 Ultraestructura de la paret cel·lular suberitzada en peridermes de patata de plantes amb silenciament conservat i control. Ultramicrografies preses amb un microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM910, a 60 kV i negatiu de pel·lícula Kodak4489.

2.4. Discussió

***StNAC103* inhibeix l'acumulació de suberina i ceres i afecta a la composició química de ceres i suberina del periderma**

La sobreexpressió d'*StNAC103* no té efectes en l'acumulació total de suberina i ceres, no afecta a l'acumulació de les classes de substàncies de cada fracció, ni tampoc afecta al perfil lipídic de cadascuna de manera rellevant. Val la pena remarcar que per aquestes línies es va verificar mitjançant seqüenciació que la construcció conservava la pauta de lectura i que el missatger s'acumulava en major quantitat en les línies de sobreexpressió. A més, la sobreexpressió d'*StNAC103* fusionada a GFP en fulles de *N. benthamiana* (Garrote Gironès 2013) ens confirma que la construcció genera una proteïna que és estable. El fet que no s'observi fenotip quan se sobreexpressa de forma constitutiva i ectòpica *StNAC103*, pot indicar que la proteïna necessita d'un altre acompanyant per poder actuar. De fet, Li *et al* (2007a) no van obtenir efecte fenotípic quan van sobreexpressar de forma ectòpica CYP86A1, mentre que observaven fenotip en l'acumulació de lípids de cutícula quan hi havia co-sobreexpressió de CYP86A1 amb GPAT5. Pel que fa a la família NAC, s'ha vist que aquests factors de transcripció interaccionen amb altres factors de transcripció, com exemples el cas de GmNAC30 i GmNAC81 (Mendes *et al* 2013) o StNAC096, que interacciona amb ABF2 i ABF4 (Xu *et al* 2013). Una altra possibilitat podria ser que, tot i que la proteïna s'acumuli, aquesta no pot ser activa perquè s'ha de modificar post-traduccionalment. Per exemple, s'ha vist que ANAC019 és funcional quan és defosforilada per la fosfatasa RCF2 (Guan *et al* 2014). Per altra banda també val la pena remarcar que el factor de transcripció SINAC1 és regulat pel sistema d'ubiquïtina i proteasoma (Huang *et al* 2013), per tant, tampoc es pot descartar que l'absència de fenotip en el fel-lema de tubercle de línies de patata de sobreexpressió ectòpica sigui degut a la degradació de l'excés de proteïna a través de proteasoma. Si bé però, val la pena remarcar tal i com s'ha comentat en el capítol 1 que no s'han identificat seqüències PEST (pèptids senyal de degradació de proteïnes) i que s'ha predit la presència de dominis funcionals de lligament a proteïnes desubiquitinizadores.

En canvi el silenciament, tant l'específic com el conservat, d'*StNAC103* té efectes en la suberina i les ceres. En les línies silenciades hi ha un augment en la càrrega total, en la quantitat de classes de substàncies i el perfil lipídic de la majoria d'aquestes substàncies. Val la pena remarcar que hi ha un augment considerable en els àcids grassos de cadena molt llarga, sense observar una disminució proporcional dels seus precursors. Així doncs, s'observa que el silenciament d'aquest factor de transcripció es correlaciona amb un augment dels alcans de les ceres, mentre que en la suberina s'observa augment en els alcohols, els ω -hidroxiàcids i el ferúlic. Aquests resultats suggereixen que *StNAC103* és un repressor de la transcripció de

gens involucrats en la biosíntesi de lípids, ja sigui de manera directa o indirecta. En base al perfil lipídic de suberina i ceres de les línies modificades, les dianes d'StNAC103 podrien ser gens implicats en la síntesi *de novo* d'àcids grassos (que té lloc als plastidis), en l'elongació d'àcids grassos (que té lloc al reticle endoplasmàtic) i que permet l'obtenció d'àcids grassos de cadena molt llarga, i també en aquelles activitats enzimàtiques que permeten obtenir les diferents classes de substància. Tenint en compte per exemple, que en les línies silenciades per StKCS6 (Serra *et al* 2009a) hi havia una disminució dels àcids grassos de cadena molt llarga, de 28 carbonis o superiors, i que en canvi, els precursors (C_{26} i més curts) augmentaven a un nivell proporcional, els nostres resultats amb les línies silenciades reforcen la hipòtesis que StNAC103 afecta no només alguns gens que modifiquen els àcids grassos sinó també la via de síntesi *de novo* i l'elongació d'àcids grassos. Reforça aquests resultats l'observació que la síntesi d'àcids grassos es veu induïda tant en la línia NSC com NSE respecte a la salvatge quan s'analitzen els transcriptomes dels peridermes (2 gens que codifiquen per cetoacil-ACP reductasa estan regulats positivament en les línies silenciades, amb mitjanes de "log2 ratio" de 3,6 i 2,4). Pel que fa a l'obtenció d'àcids grassos de cadena molt llarga però, val la pena esmentar que mentre que aquesta via en general es veu induïda a nivell de transcriptoma en NSC, en NSE no s'observa de forma tan evident l'activació de la via d'elongació d'àcids grassos de cadena molt llarga (Mercè Figueras, comunicació personal). En aquest context, on es constata un augment de la producció de precursors i alhora, un increment de l'elongació d'àcids grassos, també és interessant notar que en determinats casos es detecta la disminució de la quantitat d'àcids grassos de cadena llarga, fet que suggereix que es podria donar un petit efecte de coll d'ampolla.

El silenciament d'StNAC103 té un efecte molt clar en els alcans pel que fa a quantitat total, i tots els compostos, de C_{21} a C_{29} es veuen incrementats en els dos tipus de silenciament. En el periderma de tubercle de patata els alcans representen un 17,5 %, que es veu incrementat fins a un 40 % en el silenciament conservat. Els alcans s'obtenen a partir de la reducció dels VLCFAs a aldehids i la descarbonilació d'aquests. Bernard *et al* (2012) postulen que CER3, juntament amb CER1 i el cofactor CYTB5, intervenen en la formació dels alcans en Arabidopsis. Per tant, tenint en compte el fenotip de les ceres de les línies silenciades per StNAC103, és possible que en aquestes transgèniques es potenciï la via de descarbonilació dels aldehids. En base al que es coneix ara de la via de biosíntesi dels alcans i dels seus transportadors (Yeats i Rose 2013), CER3, CER1, CYTB5, CER26, CER2, CER26-like (Pascal *et al* 2013) i ABCG11 (Panikashvili *et al* 2007, Panikashvili *et al* 2010) són possibles dianes d'StNAC103. A més, ABCG11 ha estat relacionat amb la suberina i els mutants defectius per a aquest gen produeixen una suberina a les arrels amb una càrrega lleugerament menor d'àcids, alcohols i ω -hidroxiàcids (Panikashvili *et al* 2010). Concorda amb això i val la pena esmentar, que en el transcriptoma de pela de patata silenciada (NSC) s'observa un augment en el "log2 ratio" respecte a les línies salvatges de l'ortòleg de CER1, CER26 i ABCG11 de patata (valors de "log2 ratio" de 2,16 a 3,89). No obstant, en les línies de silenciament específic, que

també mostren un augment en els alcans, no s'observa una inducció similar d'aquests gens (Mercè Figueras, comunicació personal).

L'augment en l'acumulació d'alcohols és molt evident en la suberina i va acompanyada d'una disminució en els àcids de forma molt evident en NSC. En les ceres no s'observa un augment evident en els alcohols, si bé l'augment dels èsters en les línies NSC concorda amb l'augment dels alcohols en la suberina, ja que els èsters són el resultat de l'esterificació dels alcohols amb el ferúlic. Aquests resultats suggereixen que hi ha una activació de la reducció dels àcids grassos a través de reductases o FAR (*Fatty Acid Reductases*) (Domergue *et al* 2010). En la mateixa línia d'evidències, la base de dades ATTED-II (<http://atted.jp/>) mostra que l'ortòleg d'*Arabidopsis* ANAC058 es co-expressa amb *FAR4* i *FAR5*, un dels gens que mostra un efecte clar en l'acumulació d'alcohols de C₂₀ de la suberina. Val la pena remarcar que el primer lot d'estudi del transcriptoma de fel·lema de NSC es va trobar inducció de *FAR5*, si bé però aquests resultats no es van confirmar en el segon lot d'estudi.

L'augment d' ω -hidroxiàcids tant en NSC com NSE, és indicatiu que en silenciar *StNAC103* augmenta la capacitat d'hidroxilació d'àcids grassos. Es va demostrar que *CYP86A33* de patata tenia un efecte clar en la hidroxilació de C_{18:1} (Serra *et al* 2009b) -així com el seu ortòleg d'*Arabidopsis* *CYP86A1* (Li *et al* 2007a, Höfer *et al* 2008) - i que la mutació en aquest gen no només afectava a l' ω -hidroxiàcid de C_{18:1}, sinó també als diàcids. Pel que fa a la hidroxilació en posició ω de C₂₂ i C₂₄, es va demostrar que *CYP86B1* hi tenia un paper important (Compagnon *et al* 2009). Val la pena senyalar que l'anàlisi de l'ortòleg ANAC058 a ATTED-II mostra co-expressió amb *CYP86B1*. Si bé però, els resultats obtinguts del transcriptoma de la línia NSC van mostrar inducció en *CYP86A33* i l'ortòleg de patata de *CYP86B1* d'un primer lot ("log₂ ratio" d'1,52 i 2,05 respectivament). L'anàlisi d'NSC i NSE d'un segon lot no mostra efectes a nivell d'inducció d'aquests dos gens. Aquests resultats del transcriptoma evidencien que la regulació gènica del periderma és complexa i que factors ambientals i de desenvolupament també poden modular la regulació gènica en les línies silenciades. En tot cas, és probable que *StNAC103* reprimeixi *CYP86A33* i l'ortòleg de *CYP86B1* a patata en determinats moments. La co-expressió d'ANAC058 amb *CYP86B1* sembla contradir els resultats de l'anàlisi química i transcriptòmica, si bé però cal tenir present que l'acumulació de missatger no necessàriament implica activitat de la proteïna i que quan convé una regulació molt fina de determinats processos s'activa simultàniament el gen i el seu repressor.

L'augment dels èsters de les ceres, i els alcohols i el ferúlic de la suberina, pot ser indicatiu que l'activitat de les feruloïl transferases està potenciada ja que, per exemple, s'ha vist que l'FHT està implicada en l'esterificació del ferúlic (Serra *et al* 2010b) a l' ω -hidroxiàcid de C_{18:1} i els alcohols. Així, el silenciament d'FHT *in planta* es correlaciona amb una disminució a nivell d'èsters de ferulat de les ceres, i dels alcohols, el ferúlic i l' ω -hidroxiàcid de C_{18:1} de la suberina. Recolza aquesta hipòtesi que en l'anàlisi del primer lot del

transcriptoma de peles de patata NSC s'observava la inducció d'FHT ("log2 ratio" d'1,58). No obstant, en el segon lot no es van obtenir aquests resultats. Per altra banda, el fet que hi hagi més quantitat de ferúlic en la suberina de les línies silenciades per a *StNAC103* també podria ser degut que gens de la via dels fenilpropanoides estiguessin potenciats. El que s'ha observat és que tant en el silenciament conservat com en l'específic s'indueixen gens biosintètics de fenilpropanoides relacionats amb la suberina com la ferulat 5-hidroxilasa i cafeic acid-O-metiltransferasa que presenten valors de "log2 ratio" d'1,71 a 2,14 (Mercè Figueras, comunicació personal).

La regulació de les ceres i la suberina és complexa i ha d'integrar diferents vies que responen a diferents estímuls. A tall d'exemple, ja el 1989, Dean (Dean 1989) va observar que durant la suberització cicatricial del tubercle, la temperatura afecta de manera diferent la deposició de suberina i ceres. A temperatures més altes (26°C) s'afavoreix la suberina (diols) i les temperatures més baixes (18°C) estimulen l'acumulació de les ceres (alcans) i també va observar variacions en la llargada de la cadena. La regulació de les ceres cuticulars ha estat objecte de diferents estudis degut a la seva importància, ja que protegeixen de la deshidratació (Shepherd i Wynne Griffiths 2006, Kosma *et al* 2009) i les radiacions (Kunst i Samuels 2003), i també participen en la protecció contra fongs (Lee *et al* 2009) i interaccions amb insectes (Eigenbrode i Espelie 1995). Diferents estudis han identificat diversos reguladors de la biosíntesi de les ceres (Samuels *et al* 2008, Li-Beisson *et al* 2010, Lee i Suh 2013) (Taula 6). Entre aquests hi ha factors de transcripció de les famílies AP2/EREBP, MYB, HD-ZIP i WW domain; per alguns d'aquests com és el cas de WIN1/SHN d'*Arabidopsis* es coneix una acció directa inductora dels gens de la via de síntesi d'alcans (CER 1 i CER3). Per altra banda, en referència als factors de transcripció *Wrinkled* s'ha vist que tenen un efecte clar en la síntesi *de novo* dels àcids grassos a través d'enzims com l'ACP tioesterasa d'àcids grassos, la cetoacil-ACP reductasa, la cetoacil-ACP sintasa i la *biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase* (To *et al* 2012). En el primer anàlisi del transcriptoma de periderma d'NSC (Mercè Figueras, comunicació personal) es va trobar inducció de *Wri1* i *Wri3*, juntament amb gens regulats per els *Wrinkled*, com la *biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase*, la piruvat deshidrogenasa i la piruvat cinasa. En el segon lot no es va poder detectar diferències estadísticament significatives per a *Wri1* i *Wri3*, no obstant, en el silenciament específic i conservat hi havia inducció forta de dues cetoacil-ACP-reductases (nivells de "log2 ratio de 2,33 a 4,30).

El fet que les anàlisis químiques de suberina i ceres de peridermes d'NSC donin un fenotip molt més acusat que les d'NSE suggereix que la construcció utilitzada a NSC silencia altres membres de la família NAC. Els factors de transcripció són proteïnes difícils d'estudiar ja que poden afectar diferents activitats enzimàtiques de forma simultània, tenen un efecte fonamental en el desenvolupament i la regulació de

processos cel·lulars i normalment formen part de famílies multigèniques que presenten molta redundància funcional (Mitsuda i Ohme-Takagi 2008). Sovint la funció d'un gen que pertany a un grup de gens amb redundància funcional no s'arriba a poder resoldre perquè les diferències funcionals entre els membres del grup son molt petites o inexistents, o bé perquè els diferents membres del grup són requerits en situacions ambientals molt determinades (Martienssen 1998, Lopez-Molina i Chua 2000). En el cas d'StNAC103, l'estratègia dissenyada mitjançant el silenciament específic i conservat del gen, ens ha permès identificar una funció biològica específica d'StNAC103 i constatar una situació de solapament funcional o cooperació amb altres NAC/NAM del mateix grup. No obstant, les dades d'RNA-seq (Mercè Figueras, comunicació personal) no han evidenciat el silenciament d'altres membres de la família NAC. Anàlisis preliminaris de Real time apunten que StNAC96, ortòleg a ANAC78 d'Arabidopsis podria estar lleugerament silenciada amb valors de FC (silenciada/salvatge) de -2,8. A més, si tenim en compte la complexa regulació post-transcripcional de la família NAC, com per exemple a través de miRNA, no es pot descartar que just en el moment d'analitzar el transcriptoma els possibles paràlegs no es poguessin detectar degut al silenciament natural en la línia salvatge. És evident a través de l'anàlisi química de suberina i ceres que les dues construccions tenen efectes diferents, per tant, en algun moment del desenvolupament del fel·lema és possible que altres NAC tinguin un paper repressor rellevant. Així, amb el silenciament conservat hi hauria un major alliberament de la repressió. A més, si tenim en compte que els NAC poden formar heterodímers (Hegedus *et al* 2003) o homo, una altra hipòtesi possible és que StNAC103 heterodimeritzi amb el paràleg silenciada, de manera que l'efecte quan es silencien tots dos acompanyants podria ser més acusat.

StNAC103 no té efectes en l'organització del fel·lema, la disposició lamel·lar de la paret de suberina ni en la permeància hídrica del periderma

Tot i els efectes que provoca el silenciament de la zona específica i el de la zona conservada d'StNAC103 en la composició química de les ceres i la suberina, el silenciament de la zona conservada d'StNAC103 no té efectes detectables a nivell del nombre de capes cel·lulars del fel·lema ni l'organització del teixit, tal com s'havia observat, per exemple, en el silenciament d'*FHT*. En el silenciament d'*FHT* s'observaven moltes més capes cel·lulars, el teixit estava menys cohesionat i s'esquerdava (Serra *et al* 2010b, Serra *et al* 2010a). Pel que fa a l'organització lamel·lar de la suberina, aquesta presenta una organització similar a la salvatge, la qual cosa no és d'estranyar, tenint en compte que els diàcids i els ω -hidroxiàcids no disminueixen sinó que augmenten. En l'únic cas que es va observar desorganització en la disposició lamel·lar de la suberina va ser

en les línies silenciades per CYP86A33 les quals tenien una menor càrrega de suberina, i l' ω -hidroxiàcid i diàcid de C_{18:1} es trobaven en quantitats molt reduïdes (Serra *et al* 2009b).

En aquest treball s'ha comparat la permeància hídrica del periderma de les línies de sobreexpressió d'*StNAC103* respecte a les salvatges. Les línies de sobreexpressió han mostrat uns nivells de permeància hídrica similars a la salvatge. Aquests resultats són coherents amb els resultats de la composició química de suberina i ceres, ja que les línies de sobreexpressió no presenten diferències respecte a la línia salvatge. No obstant, en un altre treball es va analitzar la permeància hídrica dels peridermes d'NSC i NSE per tal de valorar si l'increment obtingut en la càrrega de suberina i ceres, i determinats tipus de substàncies com els alcans i èsters en les ceres, i els ω -hidroxiàcids i alcohols en la suberina, podia conferir una major protecció davant la deshidratació. En aquestes línies tampoc es van observar diferències significatives en la permeància hídrica, mesurada amb els mètodes gravimètrics (Quintana Vehí 2013) i, per tant, el silenciament d'*StNAC103* ni millora ni empitjora la capacitat protectora dels peridermes. En canvi, Li *et al* (2007a) van trobar en *Arabidopsis* que la co-sobreexpressió de *CYP86A1* (ortòleg de *CYP86A33* de patatera) juntament amb *GPAT5*, que permetia un increment del 80% de la càrrega total de lípids i l'aparició en la cutícula de compostos típics de la suberina (ω -hidroxiàcids i diàcids de C₂₀ i C₂₂), es correlacionava amb una major pèrdua d'aigua. El fet que l'augment en la càrrega del lípids no doni lloc a una protecció davant la deshidratació suggereix que l'organització estructural també té un paper determinant en la permeabilitat hídrica de les barreres de l'apoplast.

Reguladors de la biosíntesi de ceres

Nomenclatura	Activitat	Regula
WIN (<i>Wax Inducer</i>)/SHINE 1/SHN1 (Kannangara <i>et al</i> 2007)	Factor de transcripció de CER1, CER2, KCS1, LACS2, GPAT4, CYP86A4	Augment d'alcans i aparença lluent de les fulles
SHN2 (Aharoni <i>et al</i> 2004)	Factor de transcripció	Augment de components de les ceres
SHN3 (Aharoni <i>et al</i> 2004)	Factor de transcripció	Augment de components de les ceres
MYB30 (Raffaele <i>et al</i> 2008)	Factor de transcripció	Elongació d'àcids grassos i metabolisme de la cutícula
MYB41 (Cominelli <i>et al</i> 2008)	Factor de transcripció	Elongació d'àcids grassos i metabolisme de la cutícula
MYB96 (induïble per ABA) (Seo <i>et al</i> 2011)	Factor de transcripció de KCS1, KCS2, KCS6, KCR1, CER3 i WSD1	Incrementa la producció de ceres, que augmenten la tolerància a la dessecació
CER7 (Hooker <i>et al</i> 2007)	Ribonucleasa (degrada un repressor de CER3)	Biosíntesi de ceres d'epidermis
CLF1 (<i>Curly Flag Leaf 1</i>) WW domain protein (Wu <i>et al</i> 2011)	Interacciona amb l'HD-ZIP de classe IV HDG1	Regula negativament la formació de la cutícula
HDG1 (Wu <i>et al</i> 2011)	Regulació de la transcripció de BDG i FDH/KCS10	Processos clau en la formació de la cutícula
WAR3/RDR1 (<i>RNA dependent RNA polymerase 1</i>) (Lam <i>et al</i> 2012)	Produeix dsRNA del gen SGS3 (<i>Suppressor of Gene Silencing 3</i>)	Regula CER3
WAR4/SGS3 (<i>Suppressor of Gene Silencing 3</i>) (Lam <i>et al</i> 2012)	Estabilitza l'ssRNA de CER3	Regula CER3
CER9 (Lü <i>et al</i> 2012)	<i>E3 ubiquitin ligase</i> amb dianes no conegudes	Regula negativament la producció de VLCFAs
WRI1 (<i>Wrinkled 1</i>) (To <i>et al</i> 2012)		Biosíntesi àcids grassos
WRI3 (<i>Wrinkled 3</i>) (To <i>et al</i> 2012)		Biosíntesi àcids grassos
WRI4 (<i>Wrinkled 4</i>) (To <i>et al</i> 2012)		Biosíntesi àcids grassos

Taula 6 Gens reguladors de la síntesi de ceres. Es mostra els gens reguladors de les ceres identificats fins al moment.

Capítol 3

Expressió tissular i coexpressió d'*StNAC103*

Sumari

Objectiu: Determinar l'acumulació de transcrit i l'activació del promotor en teixits constitutius, cicatricials, sistèmics. Analitzar la co-expressió d'*StNAC103* amb dos gens de biosíntesi de suberina: *CYP86A33* i *FHT*.

Metodologia: Anàlisi per PCR a temps Real de l'acumulació de transcrit a través de l'obtenció de cDNA i la quantificació respecte a un gen d'expressió constitutiva. Anàlisi de l'activació del promotor a través de la fusió d'aquest als gens deladors *GUS* i *GFP*, i inserció de la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* al genoma de patata mitjançant el T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*. La transformació es va fer en fulla de patata (ssp. *andigena*) i es va regenerar la planta sencera mitjançant organogènesi. Donat que en els teixits suberitzats hi ha molta fluorescència endògena, l'activitat del promotor es va detectar a través de l'activitat *GUS*.

Resultats i conclusions: Tant la *Real time* com els estudis d'activació del promotor mostren que el gen s'indueix en teixits suberitzats: fel·lema, arrel i teixit cicatricial. L'activació del promotor es localitza de forma conspícua a les capes basals del fel·lema i la capa de tancament del teixit cicatricial, i dèbilment en les cèl·lules de l'endoderma i exoderma de l'arrel. Tant en tubercle com fulla ferida, s'observa que el patró temporal d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* és similar al del *CYP86A33*. En canvi, el missatger d'*FHT*, s'indueix com a mínim un dia abans que el d'*StNAC103* i *CYP86A33*. La inducció d'*StNAC103* en una fulla no ferida de planta ferida evidencia que l'estrès mecànic és capaç d'induir l'activació d'*StNAC103* de forma sistèmica.

3.1. Introducció

El gen *NAM* de surera (*QsNAC*), l'ortòleg del qual és *StNAC103*, presenta una major acumulació de transcrit en fel·lema respecte a massa proliferativa d'embrió somàtic i respecte a xilema (Soler *et al* 2007). A més a més, l'estudi d'acumulació del transcrit *QsNAC* en fel·lema de surera durant l'estació vegetativa demostra que aquest gen s'indueix d'abril a setembre i té un màxim d'acumulació el Juny (Soler *et al* 2008). El Juny és el mes en el qual té lloc la pela del suro perquè és quan el creixement del suro és major degut a una gran activitat del fel·logen. El perfil d'acumulació de transcrit de *QsNAC* coincideix amb el dels gens de surera *GPAT5*, *CYP86A32* (ortòleg a *CYP86A33* de patatera) i *HCBT* (ortòleg a *FHT* de patatera). Per a aquests tres gens s'ha demostrat la implicació dels seus ortòlegs d'*Arabidopsis* (*GPAT5*, *CYP86A1/Horst* i *RWP1/ASFT*, respectivament) en la biosíntesi de la suberina i, fins i tot, s'ha vist que els mutants *gpat5* i *rwp1* tenen augmentada la permeabilitat hídrica en arrels i llavors, i major sensibilitat a estrès salí (Beisson *et al* 2007, Li *et al* 2007a, Höfer *et al* 2008, Gou *et al* 2009, Molina *et al* 2009). També s'ha demostrat paral·lelament que el silenciament dels gens de patatera *CYP86A33* i *FHT* (ortòlegs a *CYP86A1* i *ASFT* d'*Arabidopsis*) té efectes evidents a nivell de composició química de la suberina i ceres del periderma, ja que en el primer cas es dona una disminució en els ω -hidroxiàcids i diàcids de suberina i en el segon cas disminueixen els ferulats èster de suberina i ceres (Serra *et al* 2009b, Serra *et al* 2010b). Aquestes modificacions en la composició química del periderma afecten en els dos casos a la seva funció barrera, ja que la permeància hídrica augmenta de forma evident. A més a més, es va veure que el silenciament de *CYP86A33* provoca una alteració de la disposició lamel·lar de la suberina (Serra *et al* 2009b) i que la pèrdua d'*FHT* dona lloc a una desorganització del fel·lema (Serra *et al* 2010b). Així doncs, el gen *NAM* de surera es co-expressa en el fel·lema, durant el creixement vegetatiu, amb gens implicats en la biosíntesi de suberina i ceres, que són bàsics per la funció barrera del periderma.

L'anàlisi del patró d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en patatera mitjançant *Northern blot* va mostrar expressió del gen en periderma i arrel, mentre que en fulla, tija i parènquima no es va detectar acumulació de missatger (Soler 2008). Per tant, en el moment de començar aquest treball teníem evidències que el gen s'expressava en teixits suberitzats, no obstant, encara hi havia alguns aspectes per aclarir del perfil d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* com ara la capacitat de la ferida per induir l'expressió del gen, afinar en quines cèl·lules del periderma i l'arrel s'indueix el gen i entendre millor quins factors externs n'indueixen l'expressió. Per tal de disposar d'un model que permetés localitzar l'expressió del gen a nivell cel·lular, fos complementari a l'acumulació de transcrit i permetés l'anàlisi quantitatiu i qualitatiu es van obtenir patateres transgèniques ssp. *andigena* establement transformades, que continguessin gens deladors sota

control del promotor. La subespècie *andigena* té l'avantatge que la tuberització és induïble per fotoperíode i per tant es pot obtenir tubercles de forma sincrònica en les diferents etapes del desenvolupament. Amb l'objectiu d'aconseguir el màxim nombre d'elements reguladors en cis, es va aïllar un fragment de 2291 pb que està a 5' del principi de la zona codificant d'*StNAC103*. Aquest fragment es va inserir davant de la zona codificant dels gens marcadors *GUS* i *GFP* i per tant, l'activitat de l'enzim *GUS* o la fluorescència de *GFP* delaten l'activació del promotor. Aquestes plantes de patatera han estat un bon model per aquest treball perquè han permès localitzar a nivell cel·lular l'activació del promotor, però a més poden ser molt útils en base al que ara sabem per determinar de forma quantitativa la capacitat d'activació del promotor a través de senyals externes com hormones i estressos o avaluar com s'activa el promotor al llarg de la tuberització.

3.2. Material i mètodes

Condicions de cultiu

La propagació *in vitro* de les plantes de patata utilitzades es va dur a terme fent créixer esqueixos de tija en condicions d'esterilitat, en medi Murashige and Skoog (Duchefa) enriquit al 2 % (p/v) amb sacarosa (2MS). Les plantes van créixer en fitotrons amb un fotoperíode de 12/12 h i $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de llum.

La tuberització *in vitro* de les plantes *ssp. andigena* es va aconseguir pel mètode desenvolupat per Dobránszki (2001). Es prenia 2 nodes de tija i es cultivaven en medi MS enriquit al 8 % (p/v) amb sacarosa (8MS). La iniciació del procés de tuberització es va provocar mitjançant condicions de dia curt (8/16 h de llum/foscor), a 22°C i $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de llum, durant una setmana. Seguidament es va mantenir les plantes en foscor per al desenvolupament dels micro-tubercles.

Determinació de l'abundància relativa de transcrit per mitjà d'RT-PCR

Extracció d'RNA pel mètode de Z6

Logemann et al (1987)

- Precaucions al treballar amb RNA

L'alta presència d'RNases arreu fa que l'RNA sigui una molècula molt poc estable, per la qual cosa en tot el procés d'extracció cal treballar en condicions lliures d'RNasa (*RNase free*). Això significa que tot el material que haurà d'estar en contacte amb l'RNA haurà de complir certes especificacions per garantir-ne la seva integritat. En concret, el material de vidre ha d'estar fornejat a 200°C durant 8 hores; les solucions de laboratori s'han de preparar amb aigua DEPC, el qual inactiva les RNases; el material de plàstic ha de contenir especificacions concretes per part del fabricant en les quals es garanteix l'absència d'RNases.

- Protocol

Utilitzat per extreure l'RNA total de periderma, parènquima, fulla, tija i arrel de patata (*S. tuberosum*), 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 que permet inactivar les ribonucleases endògenes durant el procés d'extracció de l'mRNA del teixit i preservar la qualitat de l'RNA.

Es va usar 600 µl (10:1, Z6: β-mercaptoetanol) en cada mostra. Les mostres constaven de teixit congelat en N₂ líquid, triturat en un morter sense permetre que es descongelés. El material en pols que en resultava s'afegia en un vial d'1,5 ml amb el volum esmentat de Z6, fins a omplir un volum d'1 ml. Tot seguit s'hi afegia 500 µl de fenol àcid: cloroform: isolamilalcohol (125:24:1) i s'agitava vigorosament amb el vòrtex. El resultat s'incubava en gel mentre es processava la resta de mostres. A continuació es separaven les fases amb una centrifuga de sobretaula a 4°C durant 60 min a 11.000 rpm. El sobrenedant aquós es reservava i s'hi afegia 1/10 v d'àcid acètic 1 M i 1 v d'etanol al 100 %. L'RNA es deixava precipitar a -80°C durant 1 h i seguidament es centrifugava durant 15 min a 13.000 rpm a temperatura ambient. El precipitat es rentava amb 500 µl d'etanol al 70 % i seguidament es centrifugava 10 min a 13.000 rpm. Al precipitat s'hi afegia 200 µl d'acetat sòdic 3 M (pH 5,2) per tal d'eliminar els polisacàrids, que co-precipiten amb l'RNA, i s'agitava vigorosament amb el vòrtex. Seguidament es repetia el rentat amb etanol al 70 % i després s'eliminava completament l'etanol amb l'ajut d'una segona centrifugació i deixant-lo assecar 2 min a 42°C. El precipitat es resuspensia amb aigua tractada amb DEPC, en agitació a temperatura ambient durant 20 min. Tot seguit, per eliminar restes de sacàrids, s'escalfava 5 min a 65°C i seguidament s'incubava 15 min en gel. Finalment es centrifugava durant 10 min i es reservava el sobrenedant en un altre tub.

La qualitat de l'extracció es determinava 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 pel fabricant de Nanodrop. També es reservava una alíquota de 10 µg per dur-hi a terme una digestió DNasa i una altra d'1 µg per comprovar en un gel de desnaturalització si l'RNA era íntegre.

Digestió DNasa lliure d'RNases (RNase-free)

La digestió de l'extracte d'RNA amb DNasa és necessària per prevenir la contaminació de DNA genòmic, ja que en cas contrari aquest podria alterar els resultats de la quantificació del cDNA. La DNasa que es va fer servir és la TURBO DNasa de la casa comercial Ambion (cat#2238), concretament *TURBO DNase Treatment and Removal Reagents* (cat#1907). Aquest kit està dissenyat per treure el DNA contaminant de les preparacions d'RNAi per treure subseqüentment les DNases i els cations divalents de la mostra. S'eliminen els cations divalents com ara el magnesi i el calci perquè aquests poden afavorir la degradació de l'RNA quan s'escalfa la mostra. Es tractava amb DNasa 10 µg d'RNA total en un volum de reacció de 50 µl, segons les indicacions de la casa comercial, però a més, s'hi afegia durant la digestió 1 µl d'inhibidor d'RNasa (RNase OUT, Invitrogen, cat#10777-019) i 5 mM de DTT per prevenir la degradació de l'RNA.

Electroforesi d'RNA en gel de formaldehid

Maniatis *et al* (1983)

La qualitat de l'RNA es comprovava mitjançant gel d'agarosa desnaturalitzant, normalment després del tractament amb DNasa, si els rendiments obtinguts en el Nanodrop després de l'extracció d'RNA eren correctes. Els gels d'agarosa desnaturalitzants es fan servir per a analitzar l'RNA perquè aquest pot formar estructures secundàries a través d'aparellament de bases intramoleculares evitant la seva correcta migració. A més, 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. 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). El gel preparat doncs, era a l'1,5 % d'agarosa, 1,5/10 (v/v) de formaldehid en tampó MEN (20 mM de MOPS, 5 mM d'acetat de sodi, 1 mM d'EDTA¹, ajustat a pH 7,0 amb NaOH). Primerament es fonia l'agarosa en aigua DEPC i posteriorment, s'hi afegia el formaldehid i el tampó MEN (a partir d'aquest moment es treballava sota campana extractora de gasos degut a la toxicitat del formaldehid). Un cop solidificat en el motlle, el gel es dipositava en una cubeta d'electroforesi, enrasat amb tampó MEN. Per minimitzar l'evaporació del formaldehid, el gel es recobria amb una membrana de parafilm. Les mostres es preparaven a 1 µg d'RNA 5 µl⁻¹ en una solució 1:1,5 de mostra d'RNA: tampó de càrrega (10:4:6 de formamida: MEN 10X: formaldehid, i amb 1 µl de bromur d'etidi) i s'incubaven 5 min a 65°C. Posteriorment es mantenien en gel fins a carregar-les en el gel de formaldehid. Seguidament es

¹EDTA 0,5 M (pH 8, ajustat amb NaOH): 181,1 g de *disodium ethylenediaminetetra-acetate* • 2H₂O en 800 ml d'H₂O DEPC.

carregaven les mostres al gel de formaldehid. Es prenia cura de carregar en alguna butxaca lliure tampó de blau de bromofenol (5 μ l de glicerol, 2×10^{-2} μ l d'EDTA² 0,5 M, $2,5 \times 10^{-5}$ g de blau de bromofenol i 5 μ l d'H₂O DEPC) per delatar l'avanç de la mostra. Finalment, es connectava el gel a 3-4 V cm⁻¹. També es supervisava que les butxaques no quedessin buides i quan convenia, s'hi afegia tampó MEN.

Síntesi de cDNA

Un cop verificada la integritat i concentració suficient de l'RNA, es procedeix a sintetitzar cDNA monocadena amb encebadors aleatoris i el *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* amb inhibidor d'RNasa (Life technologies, cat# 4374966). La quantitat d'RNA que es fa servir és 1 μ g d'RNA i es segueixen les indicacions de la casa comercial. Aquest *kit* dona bons rendiments quan es pretén quantificar el cDNA a través de PCR a temps real.

Quantificació per PCR a temps real

La PCR a temps real es va realitzar en plaques òptiques de 96 pous amb ABI PRISM 7300 Sequence Detector System (Applied Biosystems). El disseny d'encebadors (veure llistat a l'Annex II) de *Real time* es va realitzar amb el programa Primer 3 (Rozen i Skaletsky 1999) i es va comprovar amb el Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Es va tenir present que els paràmetres s'ajustessin tant com fos possible als següents paràmetres de qualitat:

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

² En aquest cas, autoclavat.

La detecció dels amplicons obtinguts es va realitzar mitjançant SYBR Green que s'intercala en el DNA de doble cadena (Life technologies cat# 4367659) , motiu pel qual posteriorment a l'amplificació es feia una corba de desnaturalització per tal de verificar la presència d'un sol pic que correspondria a un sol amplicó. Les reaccions contenien la barreja de reactius del Power SYBR-Green a una concentració final 1X, 300 nM de cada encebador i 5 µl de la dilució convenient del DNA motlle (entre 1/25 i 1/200). Les condicions de la PCR són les següents: 1 x (10 min 95°C)/ 40 x (15 s 95°C, 1 min 60°C), i un pas 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 mostra/rèplica biològica. Les dades van ser analitzades amb el software 7300 SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Per generar una gràfica de l'augment logarímic de la senyal de fluorescència respecte al nombre de cicles que tingués la línia base sostreta, les dades de la línia base es van recollir entre els cicles 3 i 15. Totes les gràfiques d'amplificació eren analitzades amb un llinar d' R_n de 0,2 per obtenir el valor de C_t (*threshold cycle*). L'eficiència d'amplificació de cada parella d'encebadors, es calculava a partir de dilucions seriadades d'1/5 del cDNA que anaven d'1/1 a 1/3.125 i amb l'equació: $E=(10^{-1/\text{pendent}})$. Es considera que l'eficiència de l'amplificació ha d'estar al voltant de 2, l'òptim teòric, que pot variar degut a les condicions que té lloc la reacció, la contaminació, l'error en la mesura i la variabilitat que pugui presentar cada gen en la seva amplificació. Els valors recomanats d'eficiència estan entre 1,9 i 2,05, amb coeficients d' R^2 sempre superiors a 9,8 (Nolan *et al* 2006). En cas de no complir aquests paràmetres, s'ha repetit l'assaig d'eficiència i s'ha comprovat que els reactius es trobaven en bones condicions. En cas necessari, s'ha redissenyat els encebadors. L'abundància d'mRNA de cada candidat es calcula com abundància relativa de transcrit mitjançant la fórmula de Pfaffl (2001):

$$RTA = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t_{\text{target}}(\text{control-sample})}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{t_{\text{reference}}(\text{control-sample})}}}$$

Els gens de referència utilitzats van ser l'*adenine phosphoribosyl transferase (aprt)* i l'*Elongation Factor 1α (EF1α)*. Com a control/calibrador o RT+ es va utilitzar quantitats iguals de cada mostra per a l'anàlisi de teixits no cicatricials. Per a l'anàlisi de teixits cicatricials de tubercle, es va utilitzar una barreja de cada rèplica biològica de 144 hores després de ser ferida, com a control. Pel que fa a la fulla ferida, com a calibrador es va utilitzar una barreja de totes les fulles de plantes ferides, de 72 hores. Per cada parella d'encebadors es confirmava l'absència de DNA genòmic utilitzant el control negatiu de la transcriptasa inversa que conté la mateixa barreja d'RNAs utilitzats pel calibrador, però que no ha estat incubada amb la transcriptasa inversa (RT-). La contaminació ambiental es detecta utilitzant aigua enlloc de DNA motlle (*non template control* o NTC).

Generació de plantes transgèniques *ProStNAC103::GUS-GFP*

Disseny d'encebadors per tal d'obtenir el promotor d'StNAC103

En el moment d'iniciar aquest treball es disposava d'un fragment d'1Kb del promotor que s'havia aconseguit per *Genome Walker* (Soler 2008) de *S. tuberosum* grup Désirée. La disponibilitat de la seqüència del genoma de *S. tuberosum*, grup *Phureja*, va permetre utilitzar aquesta informació per comparar la zona del promotor d'ambdues varietats de patata. La comparació de la seqüència del promotor obtinguda d'*S. tuberosum* grup Désirée respecte a *S. tuberosum* grup *Phureja* indica que hi ha un grau d'homologia del 100 %, com s'ha esmentat al capítol 1, pel que es va considerar oportú utilitzar la informació disponible del grup *Phureja* per dissenyar encebadors més amunt de la seqüència disponible del promotor.

En el disseny dels encebadors destinats al clonatge del promotor, l'encebador invers que es trobava just abans del codó d'inici de *StNAC103* no complia els requeriments necessaris pel que fa a temperatures de fusió, ja que la temperatura d'anellament era massa elevada. Per aquesta causa, es va dissenyar un encebador invers (Annex II) sobre l'inici de transcripció d'*StNAC103*. Tanmateix, en comptes d'incloure en aquest encebador la seqüència complementària ($5'CAT^3'$) al codó d'inici $5'ATG^3'$, es va optar per introduir un malaparellament respecte la seqüència original, $5'CTT^3'$, que dona lloc a un canvi del codó d'inici per un codó $5'AAG^3'$. El malaparellament permet que no s'hagi de dissenyar l'encebador en fase amb l'inici de transcripció de la GFP, ja que elimina l'inici de transcripció d'*StNAC103* i permet que la transcripció comenci en el codó d'inici de la GFP. D'altra banda, el malaparellament no significa cap canvi en la zona del promotor, de manera que no ha d'interferir en la seva activitat.

Extracció de DNA genòmic

En un vial amb 750 µl de tampó d'extracció I (Tris HCl 100 mM a pH 8,0, EDTA 50 mM a pH 8,0, NaCl 500 mM) es va afegir la pols resultant de la congelació i polvorització en N₂ líquid d'una fulla tendra de patatera (cvar. Désirée). Es va incubar amb 50 µl d' SDS al 20 %, durant 15 min a 65°C i tot seguit es va retirar les restes d'Na⁺ incubant-ho amb 250 µl d'acetat de potassi 5 M, a 4°C i durant 15 min. Es va centrifugar a 4°C i 13.000 rpm durant 15 min, per recuperar el sobrenedant i filtrar-lo amb un filtre de paper. Es va precipitar el DNA amb 3:4 volums d'isopropanol:sobrenedant i amb una centrifugació a 13.000 rpm, durant 15 min. El precipitat es va reservar i rentar amb etanol al 70 %. Tot seguit es va dissoldre amb 150 µl de tampó d'extracció II (TrisHCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 50 mM a pH 8,0) i es va comprovar amb Nanodrop que els quocients 260/280 i 260/230 es trobaven en el rang [1,8;2,2]. Després es va retirar els polisacàrids. Per a això es va afegir 150 µl de tampó d'extracció III (TrisHCl 200 mM a pH 7,5, EDTA 50 mM a pH 8,0, CTAB al 2 % en p/v, NaCl 2 M, tot dissolt a 60-65°C), es va incubar 15 min a 65°C, després es va afegir 150 µl de cloroform i es va barrejar per retirar el CTAB. La barreja obtinguda es va centrifugar a 13.000 rpm durant 15 min i es va recollir el sobrenedant, evitant la interfase, que conté els polisacàrids. El sobrenedant resultant es va precipitar amb 0,875 volums d'isopropanol, una incubació de 5 min i centrifugació a 13.000 rpm durant 15 min. El precipitat es va rentar amb 200 µl d'etanol al 70 %, centrifugar a 13.000 rpm durant 15 min, eliminar etanol i assecar a l'aire. El pellet subseqüent es va dissoldre en 50 µl d'H₂O. Finalment es va tornar a comprovar els quocients 260/280 i 260/230, així com la concentració de DNA.

Amplificació del promotor d'StNAC103 i clonació en el sistema Gateway

Un fragment de 2291 bases a 5' de l'inici de transcripció d'StNAC103 es va obtenir mitjançant amplificació per PCR, utilitzant DNA genòmic de fulla com a DNA motlle i la DNA polimerasa *TaKaRa PrimeSTAR HS* (cat#R010A). Aquest enzim permet amplificar eficientment amplicons de 8,5 Kb i a més té una alta fidelitat (12 errors cada 250 Kb). Les condicions de la PCR van consistir en dues etapes amb temperatures d'anellament diferents per enriquir de manera específica la porció d'amplicons d'interès: 5 cicles a 98°C durant 10 segons, 55°C durant 5 segons i 72°C durant 3 minuts, i 32 cicles a 98°C durant 10 segons, 72°C durant 3 minuts i 5 segons, a més d'un pas final d'elongació a 72°C durant 7 minuts.

Per poder clonar aquest fragment en el vector d'entrada al sistema *Gateway* (pDONR207) es van utilitzar encebadors complementaris al fragment de 2291 bases, que als seus extrems 5' contenen les seqüències de recombinació attB1 i attB2 respectivament (fwr: ^{5'}GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATACCAAGAA

ATTGATACATGC^{3'} i rev: 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAGATTTTCCTCCTTTATATGACA^{3'}; annex II). El producte de PCR resultant, purificat mitjançant gel d'agarosa i QIAquick Gel Extraction (QIAGEN cat#28704), es va clonar en el vector pDONR207 mitjançant la BP clonasa II d'Invitrogen (Life technologies, cat#11789-020), i segons les indicacions de la casa comercial (Figura 27). El vector pDONR207 recombinant es va propagar mitjançant en les soques bacterianes d'*E. coli* DH5α i Top10 (cultivades a 37°C en LB i seleccionades amb gentamicina 10 µg ml⁻¹) i posteriorment es va purificar el DNA plasmídic mitjançant el protocol de Mini Preps pel mètode de la lisi alcalina (Maniatis *et al* 1983). La inserció del fragment dins el pDONR207 es va comprovar mitjançant PCR (amb els encebadors frw: 5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC^{3'} i rev: 5'TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC^{3'}, complementaris al pDONR207 i fora de la zona de recombinació; anellament de 30 s a 54°C; annex II) i digestió de l'amplicó amb l'enzim de restricció MscI (New England Biolab cat. R05345), que dona com a resultat fragments de 2191 pb i 395 pb.

Tot seguit es va dur a terme una altra amplificació de l'insert contingut en el pDONR207, per tal de millorar l'eficiència d'incorporació en el vector receptor pKGWFS7 (Karimi *et al* 2002). Els encebadors utilitzats van ser els mateixos que en l'anterior comprovació perquè l'amplicó resultant de l'amplificació ja inclouria les seqüències attL. Es va utilitzar una DNA polimerasa d'alta fidelitat (Takara) i en aquest cas, un anellament de 5 s a 63°C. El fragment de 2291 pb de promotor es va transferir a pKGWFS7 mitjançant la LR clonasa d'Invitrogen (Life technologies, cat# 11791-100). Per millorar l'eficiència de recombinació, vector i insert es van incubar 5 minuts a 65°C i la reacció amb la clonasa es va dur a terme tota la nit a temperatura ambient. La recombinació va substituir el gen letal ccdB pel fragment del promotor d'*StNAC103* i a resultes d'aquesta recombinació l'extrem 3' del fragment estava a tocar de la zona codificant de *GFP* i *GUS*. La correcta inserció del fragment dins el vector pKGWFS7 es va comprovar mitjançant enzims de restricció a partir de l'amplicó obtingut amb el vector recombinant pKGWFS7 (5'GCAATAATGGTTTCTGACG^{3'} i 5'CATGAAGCAGCAGACTTC^{3'}; anellament de 30s a 53°C; annex II). El producte de PCR es va digerir mitjançant Bcl I (Roche cat. 10693952001) perquè la digestió amb BclI donava tres fragments de mida asimètrica (1097pb, 997pb, i 772pb). A més a més es va verificar la correcta orientació de l'insert mitjançant seqüenciació amb el kit BigDye® Terminator v3.1 d'Applied Biosystems (Life technologies, cat# 4337455) de l'amplicó obtingut (frw: 5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC^{3'}, rev: 5'CATGAAGCAGCAGACTTC^{3'}; anellaments: 56°C durant 15 segons i 30s a 53°C respectivament; annex II) del DNA plasmídic purificat per *PureLink* (Invitrogen cat.K2100-10). Un cop confirmada la presència de l'insert i la seva correcta orientació dins el vector de destí es va transformar la soca GV2260 d'*A. tumefaciens* i es van seleccionar els transformants amb estreptomicina (St) i espectinomicina (Sp).

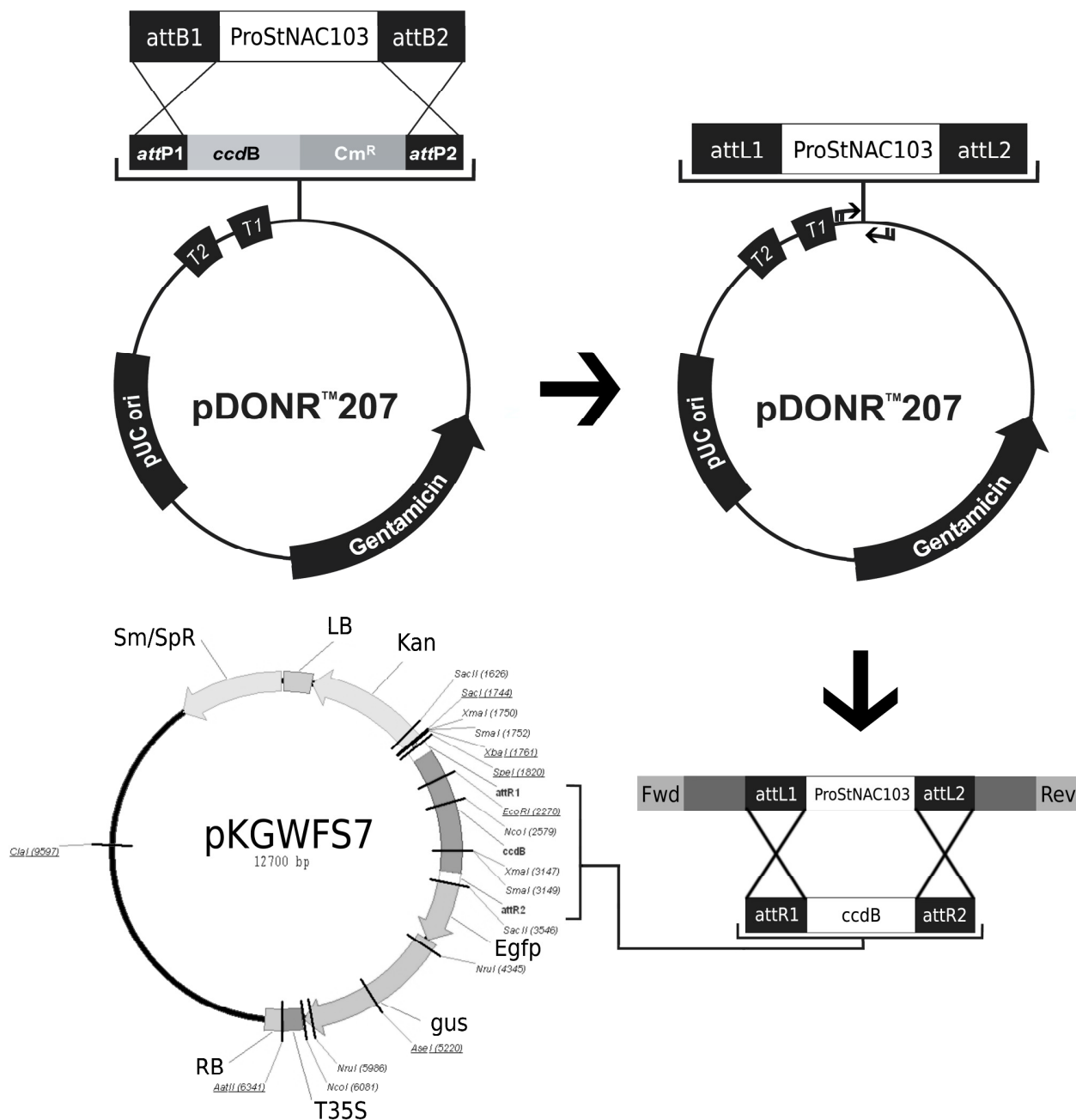


Figura 27 Clonatge del promotor d'StNAC103 dins el vector pKGWFS7. Es mostren els passos principals del clonatge. A partir del producte de PCR del promotor, amb les regions de recombinació attB incorporades, es provoca la recombinació BP de l'amplicó. Es mostra també l'amplificació mitjançant PCR d'un fragment del vector d'entrada pDONR207 que inclou el promotor d'StNAC103 i les regions attL, per tal de facilitar la recombinació LR. Seguidament es provoca la recombinació LR del producte de PCR amb el vector de destí pKGWFS7.

Transformació d'Agrobacterium tumefaciens

- Obtenció de cèl·lules competents d'*A. tumefaciens*. Soca GV2260 i LBA4404 (EHA)

Es va seleccionar una colònia d'*A. tumefaciens* i es va cultivar en 5 ml de medi YEB suplementat amb Rifampicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), St ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$) i Sp ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 28°C , en agitació, durant 48 h. D'aquest cultiu se'n va derivar un segon, amb medi fresc suplementat amb els mateixos antibiòtics, que es va dur fins a una $\text{OD}_{600} = [0,5;1]$. Tot seguit es va incubar 10 min en gel i centrifugar 20 min, a 3000 rpm, i a 4°C . Les cèl·lules es van rentar dos cops en 20 ml de TrisHCl 100 mM a pH 8,0, estèril i temperat a 4°C i centrifugar 20 min, a 3000 rpm i a 4°C . Finalment es van resuspendre en 20 ml de medi YEB i es van reservar en alíquotes de 500 μl que es van congelar en N_2 líquid i es van guardar a -80°C .

- Transformació d'*A. tumefaciens*

Es va utilitzar 1 μg de DNA plasmídic per a transformar les cèl·lules competents d'*A. tumefaciens* acabades de descongelar. El DNA plasmídic es va afegir a les cèl·lules, agitar suaument i incubar 5 min en gel. Tot seguit es va incubar 5 min en N_2 líquid, i immediatament es va transferir a 37°C , on es va incubar durant 5 min. Es va afegir 1 ml de medi YEB a les cèl·lules transformants i es va incubar en agitació 2 h a 28°C . Se'n van sembrar alíquotes de 200 i 50 μl en plaques de medi YEB amb Rifampicina (Rf) ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) i Kanamicina (Kan) ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), que es van incubar a 28°C durant de 48 h a 72 h.

Transformació de fulla de patatera (ssp. andigena)

Subseqüentment es va transformar plantes de *S. tuberosum* (*ssp. andigena*) tal com descriuen Banerjee *et al* (2006). La transformació es va dur a terme en plantes *andigena* per tal de poder induir i sincronitzar la tuberització *in vitro* ja que, en aquesta subespècie, la tuberització és induïble pel fotoperíode.

Les soques transformades d'*A. tumefaciens* es van cultivar en medi YEB suplementat amb Rf ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) i Sp ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) fins a una $\text{OD}_{600} = 0,8$. Tot seguit se'n va centrifugar 1 ml durant 2 min a 13.000 rpm i es va descartar el sobrenedant amb antibiòtics. Les cèl·lules es van resuspendre amb 0,75 ml de medi YEB i es van deixar reposar en gel fins a la inoculació. A continuació, les fulles de plantes cultivades *in vitro* durant 3 setmanes es van tallar en condicions d'esterilitat per l'àpex, la zona d'inserció del pecíol i la part medial de la fulla. Tot seguit es van dipositar en plaques de petri amb 10 ml de medi 2MS (Hussey i Stacey 1981) líquid, amb la cara adaxial en contacte amb el medi. La inoculació es va realitzar per mitjà d'afegir 80 μl del cultiu de transformació al medi 2MS líquid i es va agitar suaument i manual durant 1 min. Seguidament, les fulles es van incubar en aquest mateix medi durant 48 h en la foscor i a 24°C . Per regenerar la planta,

primerament les fulles es van transferir a una placa amb medi d'inducció de call (CIM: MS 4,4 g l⁻¹, MES 0,5 g l⁻¹, glucosa (Duchefa) 16 g l⁻¹, Plant Agar (Duchefa) 5,5 g l⁻¹, àcid naftalenacètic 5 mg l⁻¹ en DMSO, benzilaminopurina 0,1 mg l⁻¹ en etanol, Clf 250 mg l⁻¹, Kan 50 mg l⁻¹), amb la cara adaxial en contacte amb el medi i es van incubar durant una setmana en la foscor i a 24°C. Seguidament els calls es van transferir a medi d'inducció de tija (SIM: MS 4,4 g l⁻¹, MES 0,5 g l⁻¹, glucosa 16 g l⁻¹, Plant Agar 5,5 g l⁻¹, àcid naftalenacètic 0,02 mg l⁻¹ en DMSO, àcid giberèl·lic 0,02 mg l⁻¹ en H₂O, zeatinribosina 2 mg l⁻¹ en DMSO, Clf 250 mg l⁻¹, Kan 50 mg l⁻¹) i es van incubar en la foscor i a 24°C fins que les tiges crescudes van arribar a una longitud d'1 a 2 cm. En aquest punt, les tiges es van escindir prop de la base, però sense prendre call i es van cultivar *in vitro* en medi 2MS suplementat amb Clf (250 mg l⁻¹). Després de dues sessions de cultiu de tres setmanes en el medi esmentat per tal d'eliminar *A. tumefaciens*, es va continuar el cultiu *in vitro* en medi 2MS.

L'anàlisi de l'activació del promotor per ferida en tubercles *ProStNAC103::GUS-GFP* es va realitzar en talls de tubercle -al llarg de l'eix de creixement- incubats durant 48 hores a temperatura ambient, en una cambra humida i fosca. Es va utilitzar línies no transformades com a controls negatius.

Detecció d'activitat del promotor d'StNAC103

Els teixits utilitzats per a la detecció d'activitat β-glucuronidasa (de GUS) es van obtenir del cultiu *in vitro* de plantes *ProStNAC103::GUS-GFP*. El procediment de tinció s'iniciava amb una fixació dels teixits durant 20 min en acetona al 90 % i a 4°C. Tot seguit es rentava el teixit dos cops en aigua destil·lada i s'infiltrava amb una solució 0,1 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-b-d-glucuronide-sodium trihydrate (X1406.0100, Duchefa) en metanol, 50 mM de tampó fosfat (pH 7,2), 1,25 mM de K₄[Fe(CN)₆], 1,25 mM K₃[Fe(CN)₆], 10 mM EDTA, 0,05 % Tritó x-100. La infiltració de la tinció es feia durant 20 minuts en un buit suau (60 %). Finalment la mostra s'incubava a 37 °C fins que es detectava la coloració adient per a l'observació. Les mostres s'aclarien i es conservaven en etanol al 70 % (v/v) fins al moment de l'observació, que es realitzava sobre talls a mà alçada. L'observació i obtenció de les micrografies es va dur a terme a través d'un microscopi Olympus AH2 Vanox-T, així com d'una lupa binocular Wild M420 Makroskop. Les imatges es van prendre amb una càmera digital Olympus Camedic C-4040ZOOM i a través d'adaptadors Olympus U-PMTVC i C3040-ADL.

Bases de dades

S'ha cercat la informació en les bases de dades indicades en cada cas, amb els paràmetres i restriccions per defecte. Els números de referència utilitzats per a *StNAC103* són PGSC0003DMP400009522 i PGSC0003DMG400005384. Els seus ortòlegs en Arabidopsis (*At3g18400*) i tomaquera (*Solyc12g036480*) s'han trobat mitjançant l'eina blastp en les bases de dades TAIR (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) i Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>). A més, s'ha observat una relació d'ortologia d'*At3g18400* i *Solyc12g036480* amb *StNAC103* a través de blastp en patatera a Sol Genomics Network.

3.3. Resultats

Anàlisi *in silico* a nivell d'expressió i interacció amb altres proteïnes

La seqüenciació del genoma de patata (The Potato Genome Sequencing Consortium *et al* 2011) i la publicació de les dades d'RNAseq de 22.000 gens en 32 teixits i condicions de creixement d'un clon del grup Phureja (Massa *et al* 2011) és útil per planificar experiments i tenir *a priori* la informació del patró d'expressió d'*StNAC103*. A més a més, l'anàlisi de l'ortòleg d'*Arabidopsis* (*ANAC58* o *At3g18400*, amb un 72 % d'identitat a nivell de seqüència aminoacídica i valor d' $E=3e^{-78}$) permet predir co-expressió d'*ANAC58* amb altres gens o fins i tot interacció a nivell de proteïna-proteïna. Aquestes dades també poden ser d'ajuda cara a entendre millor la funció d'*StNAC103* i saber en quines rutes metabòliques pot estar implicat el gen.

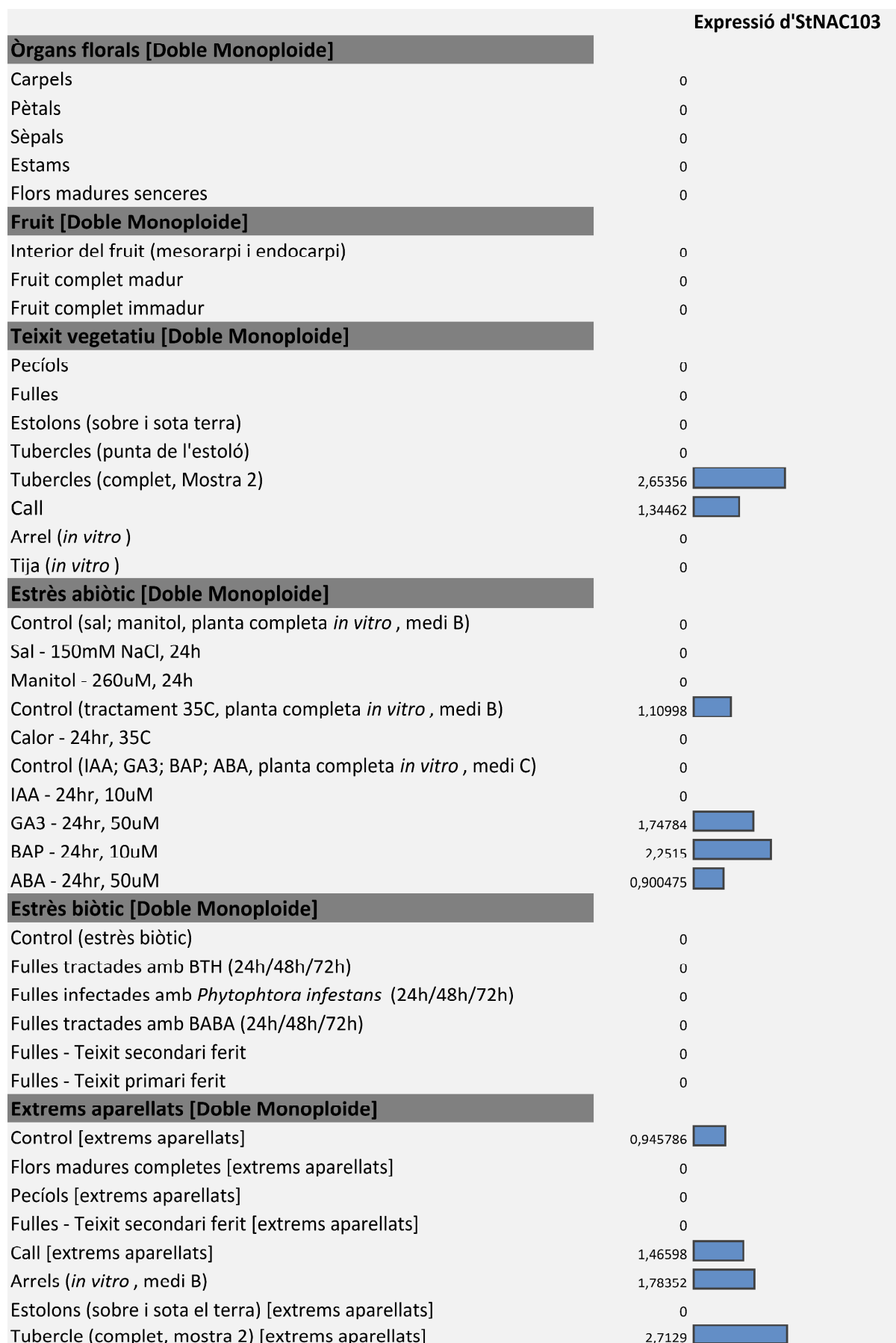
Patró d'expressió in silico

L'anàlisi del transcriptoma de dos genotips diferents de patatera (Massa *et al* 2011): doble monoploide i heterozigot diploide evidencia expressió en arrel i tubercle, inducció per gibberel·lines, citoquinines i àcid abscísic (Figura 28). Pel que fa al tubercle l'expressió es dona en tubercle madur i no en tubercle jove i específicament en la pela del tubercle (no es detecta expressió en el còrtex, la medul·la, ni en el grill del tubercle). També es detecta expressió en planta sencera cultivada *in vitro* i en call. Per altra banda, si es compara els resultats obtinguts pel control del tractament de temperatura respecte al tractament durant 24 hores a 35°C s'observa que es reprimeix l'expressió del gen. L'expressió d'*StNAC103* en pela de tubercle i arrel coincideix amb els resultats obtinguts prèviament per Soler (2008) mitjançant *Northern blot*. Concorda amb aquests resultats també, l'anàlisi de l'expressió d'*ANAC58* en les bases de dades del Genevestigator (Hruz *et al* (2008), <https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) i eFP Browser (Winter *et al* (2007), <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), que mostra expressió en arrel, coberta de la llavor i teixit en procés de creixement secundari. En la llavor d'*Arabidopsis* s'observa expressió del gen *ANAC58* a nivell de coberta i sobretot en els últims estadis de maduració. Els resultats amb Genevestigator remarquen l'expressió d'*ANAC058* a l'arrel primària i secundària i més concretament a les cèl·lules de l'endoderma i els atricoblasts -cèl·lules no pavimentoses de l'epidermis-. També es detecta inducció d'*ANAC058* en la radícula i l'estela o cilindre vascular. Pel que fa a la inducció per hormones d' *ANAC058*, el gen és induït per citoquinines i ABA. Aquesta inducció d'ABA en un cultiu de cèl·lules de guarda mostra que la inducció per ABA es pot revertir mitjançant tractament amb DMTU (dimetilglucosamina). DMTU és un

detoxificador d'espècies d'oxigen reactives i aquesta capacitat per revertir la inducció d'ABA suggereix que la inducció del gen depèn de ROS (eFPBrowser, Böhmer and Schroeder (2011)).

Anàlisi in silico de coexpressió

Els estudis de coexpressió es van fer amb *ANAC058*, utilitzant les bases de dades de Genemania (Ward-Farley *et al* 2010), Genevestigator i Expression Angler (Toufighi *et al* 2005). El llistat de gens que coexpressen, agrupats per categories funcionals, es mostra a la Taula 7. El resultat de l'anàlisi amb totes tres eines indica que *ANAC058* es coexpressa amb gens lligats a la síntesi i transport de lípids, l'estrès, la defensa i regulació. Els gens de biosíntesi que s'ha trobat són compatibles amb la síntesi de suberina. Així hi ha presents dues *fatty acid reductases* (FAR 4 i 5) de la via dels *acyl-lipids*, que generen alcohols de cadena molt llarga a partir dels corresponents àcids grassos de cadena molt llarga activats (Domergue *et al* 2010). També s'hi troba una *Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase FACT* (Kosma *et al* 2012), una *fatty acid ω-hydroxylase* corresponent a *CYP86A1*, que és l'ortòleg a *CYP86A33* de patatera (Li *et al* 2007a, Höfer *et al* 2008, Serra *et al* 2009b) i una *very long chain fatty acid hydroxylase*, *CYP86B1* (Compagnon *et al* 2009). A més, s'hi troben un seguit de proteïnes de transport de lípids, com *Lipid Transfer Proteins* (LTPs) i dos transportadors ABC, associats al transport extracel·lular de substàncies lípidiques (vegi's els treballs de Li-Beisson *et al* (2010), Chen *et al* (2009), Borner *et al* (2003), Sels *et al* (2008)).



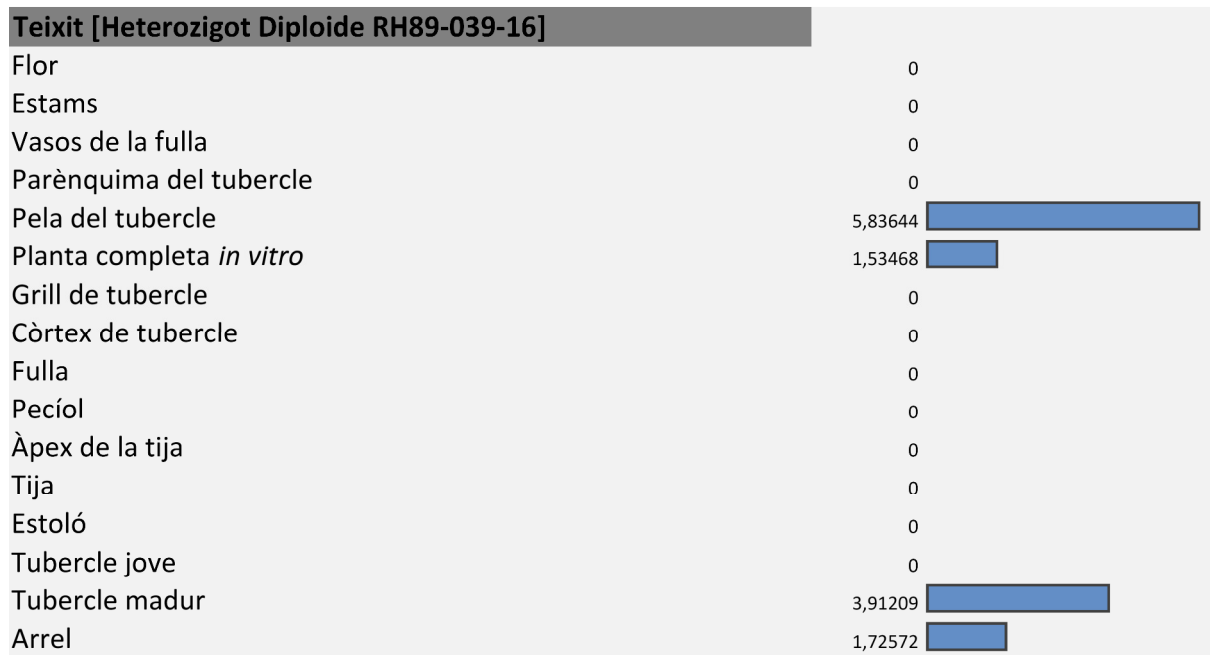


Figura 28 Patró d'expressió tissular d'StNAC103, segons el transcriptoma de The Potato Genome Sequencing Consortium *et al* (2011).

Categoria funcional	GENEMANIA			GENEVESTIGATOR			EXPRESSION ANGLER		
	Nombre d'accés	Descripció	Pes	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson
Regulació									
<u>NAC family</u>							At2g24430	ANAC038	0,765
<u>R2R3 MYB</u>	At2g18060	VND1	0,024						
	At1g34670 At2g31180	MYB93 AtMYB14	0,008 0,025	At1g34670	MYB93	0,84			
<u>WRKY</u> <u>Zinc fingers</u>							At3g12720 At2g46130	AtMYB67 AtWRKY43	0,786 0,757
	At1g04360 At2g01810	RING-H2 <i>finger</i> (ATL1) RING/FYVE/PHD zinc <i>finger-containing protein</i>	0,013 0,034	At5g22890	C2H2 and C2HC zinc fingers <i>superfamily protein</i>	0,76			
Síntesi de lípids									
	At3g44540	FAR 4 (<i>Fatty Acyl-CoA Reductase 4</i>)	0,033	At3g44540	FAR 4 (<i>Fatty Acyl-CoA Reductase 4</i>)	0,76	At3g44540	FAR 4 (<i>Fatty Acyl-CoA Reductase 4</i>)	0,793
	At3g44550	FAR 5 (<i>Fatty Acyl-CoA Reductase 5</i>)	0,042				At5g23190	CYP86B1 (<i>VLCFA hydroxylase</i>)	0,750
				At5g58860	<i>Fatty acid ω-hydroxylase</i> CYP86A1	0,81			
				At5g63560	FACT (<i>Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase</i>)	0,81	At5g63560	FACT (<i>Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Caffeoyl Transferase</i>)	0,795
Transport de lípids									
<u>ABC</u>	At3g53510	ABC transporter G family member 20	0,037	At3g53510	ABC transporter G family member 20		At2g37360	ABC transporter	0,756
<u>LTP</u>				At2g18370	LTP1 (<i>Lipid Transfer Protein 1 pathogenesis-related</i>)	0,85	At2g18370	LTP1 (<i>Lipid Transfer Protein 1 pathogenesis-related</i>)	0,808
				At2g48140	LTP5 - EDA4 (<i>Embryo sac Development Arrest 4</i>)	0,78	At2g48140	LTP5 - EDA4 (<i>Embryo sac Development Arrest 4</i>)	0,742
				At3g58550	LTP7 (<i>Lipid Transfer Protein 7</i>)	0,84	At3g58550	LTP7 (<i>Lipid Transfer Protein 7</i>)	0,781
Estrès i defensa									
<u>PRP</u>	At2g19990	<i>Pathogenesis-Related protein-1-like protein</i>	-						
<u>Peroxidases</u>				At1g68850	<i>Peroxidase</i>	0,86	At1g68850	<i>Peroxidase</i>	0,765
	At2g35380	<i>Peroxidase 20</i>	0,043	At2g35380	<i>Peroxidase 20</i>	0,80			
	At2g43480	<i>Peroxidase</i>	0,024						
<u>GDSL</u>				At2g38380	<i>Peroxidase</i>	0,77			
				At1g74460	GDSL	0,81			

Categoria funcional	GENEMANIA			GENEVESTIGADOR			EXPRESSION ANGLER		
	Nombre d'accés	Descripció	Pes	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson
<u>Altres</u>				At2g23540	GDSL	0,80			
				At3g50400	GDSL	0,76			
				At5g37690	GDSL	0,75	At5g37690	GDSL	0,741
				At5g38030	MATE <i>efflux family protein</i> (respon a nemàtodes)	0,77			
							At1g19230	<i>Riboflavin synthase-like superfamily protein</i>	0,735
						At5g04370	NAMT1 (<i>methyltransferase</i>) metila l'àcid nicotínic	0,753	
Transport i creixement cel·lular									
							At1g49960	Xanthine/uracil permease family protein	0,803
				At3g04370	PDLP4 (<i>Plasmodesmal protein</i>)	0,75	At3g04370	PDLP4 (<i>Plasmodesmal protein</i>)	0,729
							At5g09530	PELPK1 (creixement i desenvolupament)	0,757
Desconeguda									
<u>HPRP</u>	At2g22510	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,040	At4g38080	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,75	At4g38080	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,740
	At3g26550	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,028	At2g22510	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,85	At2g22510	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,811
	At5g09480	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,042	At5g09480	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,82			
	At5g09520	<i>Hydroxiprolin rich protein</i>	0,036						
<u>GRP</u>				At1g56320	<i>Glycine-rich protein family protein</i>	0,75			
	At3g24250	GRP (<i>Glicine Rich Protein</i>)	0,038	At5g49350	<i>Glycine-rich protein family protein</i>	0,76	At5g49350	<i>Glycine-rich protein family protein</i>	0,743
<u>Altres</u>							At1g24430	Proteïna de funció desconeguda (<i>acyltransferase</i>)	0,771
				At2g18360	<i>Hydrolase</i> (lipase/esterase)	0,78	At2g18360	<i>Hydrolase</i> (lipase/esterase)	0,805
							At3g26440	Proteïna de funció desconeguda (<i>glycosyltransferase</i>)	0,784
	At5g65170	<i>VQ motif containing protein</i>	0,042						
	At1g33860	Proteïna no caracteritzada	0,033						
	At2g36940	Proteïna no caracteritzada	0,041						

Categoria funcional	GENEMANIA			GENEVESTIGATOR			EXPRESSION ANGLER		
	Nombre d'accés	Descripció	Pes	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson	Nombre d'accés	Descripció	Valor de Pearson
	At2g48060	Proteïna no caracteritzada	0,050	At4g20390	UPF0497 (<i>Uncharacterised protein family</i>)	0,71			
				At5g44550	UPF0497 (<i>Uncharacterised protein family</i>)	0,81			
							At1g04330	Proteïna de funció desconeguda	0,770
							At2g47200	Proteïna de funció desconeguda	0,768

Taula 7: Gens que es coexpressen amb ANAC058, agrupats per categories funcionals, segons les eines informàtiques indicades. En referència als valors de referència donats, cada eina utilitza el seu propi algoritme i per tant, els resultats no són numèricament comparables entre ells. En el cas de Genemania es dona un pes a cada parell de gens que formen part de la hipotètica xarxa de regulació que presenta l'eina. El valor representa quin pes té la correlació de l'expressió d'ambdós gens en l'explicació de la xarxa -on 1 és el total de la xarxa, la suma de totes les interaccions possibles-. A la taula es presenta el valor del pes en referència a At3g18400. En el cas de Genevestigator i Expression Angler, s'utilitza el coeficient de correlació de Pearson en referència a l'expressió conjunta de cada gen amb At3g18400.

Pel que fa a l'estrès, hi ha presents en el llistat de gens coexpressats, dues peroxidases (*At2g35380* i *At2g43480*) relacionades amb la biosíntesi de fenilpropanoides (segons la base de dades KEGG, Kanehisa and Goto (2000)) i *NAMT1*, que codifica per una metiltransferasa que metila l'àcid nicotínic. En referència a la defensa (vegi's els estudis de, Hammes *et al* (2005), Sels *et al* (2008)) es troben els gens de resposta a nematodes *LTP8* i *At5g38030*, una peroxidasa de resposta a patògens (*At2g19990*) i una *Riboflavin synthase-like superfamily protein* (Koch *et al* 2006). En referència als gens reguladors, destaquen dos gens més de la família NAC de factors de transcripció. Un d'ells és *ANAC038*, amb una gran proximitat filogenètica respecte *ANAC058* (vegi's la figura 4 del capítol I) i una identitat del 75 % (i valor d'E=6e-70) respecte *StNAC103*. L'altre es tracta de *VND1*, involucrat en la formació del xilema (Kubo *et al* 2005). Altres reguladors que coexpressen són quatre factors de transcripció MYB (*AtMYB14,38, 67* i *93*), de la subfamília R2R3. A aquests se'ls ha d'afegir un regulador WRKY43, del grup II-c, que interacciona amb *Calmodulin Binding Transcription Factors* i amb expressió a la flor i l'hipocòtil. A més, s'hi troben diversos dits de zenc. Els reguladors de la família MYB indicats regulen processos que es poden relacionar amb la resta d'informació obtinguda, relativa a l'expressió d'*StNAC103* i *ANAC058*. Així, MYB 14 regula la síntesi d'estilbens (una classe de fenilpropanoides amb funció de fitoalexines) en resposta a l'estrès biòtic i abiòtic (Höll *et al* 2013). *MYB38 (RAX2)* és un regulador de meristemes axil·lars (Müller *et al* 2006) i *MYB93* s'ha relacionat amb la resposta a ABA i SA i s'expressa a la zona d'abscisió on es diposita lignina i suberina (Agustí *et al* 2008).

Finalment hi ha un seguit de gens de funció desconeguda, per exemple una *hydroxiproline rich protein* (*At2g22510*), sovint associades a paret cel·lular i ferida, tres proteïnes de la família de les *hydroxiproline rich proteins*, dues GRP (*Glicine Rich Protein*) (*At3g24250* i *At1g56320*) en alguns casos relacionades amb la paret cel·lular i altres amb similitud amb les citoqueratines animals (Mousavi i Hotta 2005), una *VQ motif containing protein*, que sovint interacciona amb factors de transcripció WRKY i finalment una *glycosyltransferase* i una *acyltransferase*. Per altra banda, amb el programa Genevestigator, que permet identificar gens negativament correlacionats per a la coexpressió, hem pogut veure que aquests són majoritàriament gens de regulació dels cloroplasts, i de síntesi de pigments, la qual cosa suggereix que *At3g18400* no s'expressaria en teixits on es promogui la fotosíntesi. En conjunt el que s'extreu de les dues bases de dades, Genevestigator i Genemania, és que *ANAC058* es coexpressa amb gens relacionats amb la biosíntesi i transport de lípids. L'anàlisi *in silico* doncs, reforça una possible funció reguladora de la suberització, ja sigui en condicions naturals o bé a través de l'estrès i la defensa.

Expressió en teixits nadius de patatera

Anàlisi d'acumulació relativa de transcrit

Tot i disposar de dades *in silico* pel que fa a l'expressió d'*StNAC103* i de les dades obtingudes en el *Northern blot* (Soler 2008), es va considerar oportú analitzar l'acumulació de transcrit mitjançant RT-PCR a temps real perquè és una metodologia molt més sensible que el *Northern blot*. Per altra banda val la pena remarcar que la informació dipositada en les bases de dades és molt útil però convé confirmar els patrons d'expressió, ja que hi pot haver problemes de reaccions creuades de les sondes, de sensibilitat i altres errors metodològics, i en alguns casos les bases de dades no són relatives a patatera, sinó *Arabidopsis*. S'ha mesurat l'acumulació relativa de transcrit d'*StNAC103* en diversos òrgans -tija, fulla, arrel, estoló i tubercle-. Pel que fa al tubercle es va examinar la pela, el fel·lema i el parènquima de patates tendres. La pela es va obtenir amb pelador i en conseqüència, conté periderma i parènquima. El fel·lema (teixit més extern del periderma que és el responsable de la funció protectora) es va obtenir per tracció de la pela manualment, i per tant, la fractura es dona en la zona menys cohesionada (fel·logen). L'acumulació relativa de transcrit es va obtenir per mitjà d'RT-PCR amb l'ús, com a control, del gen *aprt* (*adenine phosphoribosyl transferase*, GenBank CK270447).

Tal com es mostra a la Figura 29, a on s'observa màxima acumulació de transcrit és en els òrgans i teixits que presenten suberització constitutiva: el fel·lema, la pela i l'arrel. En canvi l'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en tija, fulla, parènquima i estoló és amb prou feines detectable. El fet que trobem major expressió del gen en fel·lema que en pela i tenint en compte que el gen no s'expressa a parènquima, suggereix que l'expressió del gen en el periderma es dona majoritàriament al fel·lema. Concretament els valors que s'obtenen de fel·lema, pela i arrel són els següents: $RTA_{Pela}=2,89e^{-1} \pm 9,43e^{-2}$ i $RTA_{Fel\cdot lema}=2,26 \pm 1,28e^{-1}$ $RTA_{Arrel}=1,36 e^{-1} \pm 1,78e^{-2}$. En canvi els valors d'RTA en els teixits no suberitzats és de dos a quatre ordres de magnitud inferior que els dels teixits suberitzats: $RTA_{Parènquima}= 1,19e^{-2} \pm 5,05 e^{-3}$; $RTA_{Tija}=3,57e^{-3} \pm 3,57e^{-3}$; $RTA_{Fulla}= 9,63e^{-4} \pm 9,63e^{-4}$; $RTA_{Estoló}= 5,98e^{-4} \pm 3,45e^{-4}$. El patró d'acumulació del transcrit doncs, és compatible amb una funció reguladora de la suberificació.

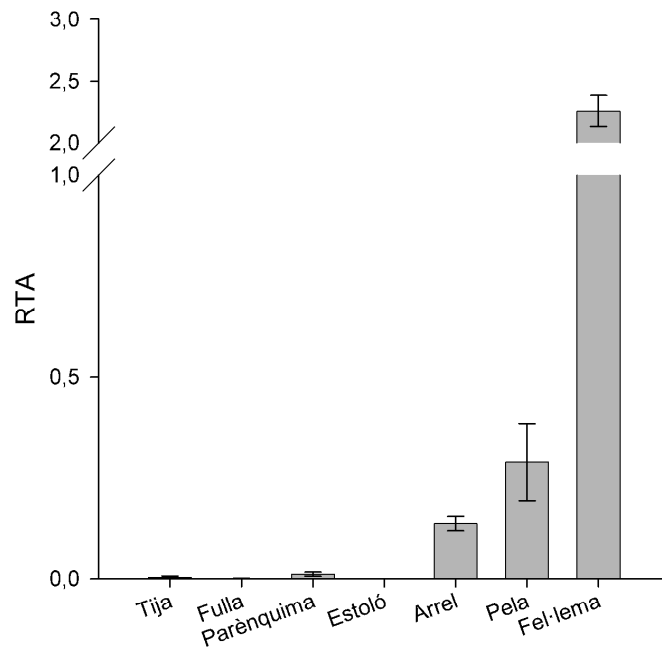


Figura 29 Abundància relativa de transcrit (RTA) d'*StNAC103* en teixits constitutius, en relació al gen *aprt*, en diferents teixits de patata mitjançant RT-PCR a temps real. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard de l'abundància de missatge en cada teixit ($n_{Tija, Fulla, Arrel}=4$, $n_{Parènquima, Pela, Estoló}=3$, $n_{Fel·lema}=2$).

Activitat del promotor d'StNAC103 en teixits natius

L'activació del promotor d'*StNAC103* es pot detectar, en plantes transformades amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP*, tant a través de l'activitat β -glucuronidasa -precipitat blau diX-indigo-, com per mitjà de la fluorescència verda emesa per la GFP. Aquest anàlisi es va dur a terme amb les línies 2, 6 i 8, que corresponen a esdeveniments independents de transformació, mitjançant l'assaig β -glucuronidasa. Es va determinar l'activació del promotor al periderma de tubercle de patata de plantes transformades, obtingut *in vitro*, mitjançant activitat β -glucuronidasa. A la Figura 30 s'hi observa diversos talls transversals d'un tubercle, incubat prèviament amb el substrat cromogènic de la β -glucuronidasa. La coloració blava es detecta a la part més interna del periderma (Figura 30, A i B), i en algunes zones es veuen dues capes cel·lulars marcades (Figura 30, C i Figura 31). L'autofluorescència que correspon a la suberina es detecta tant en la imatge D com en E. Comparant les imatges de camp clar amb les de fluorescència es veu que l'activació del promotor d'*StNAC103* té lloc a les cèl·lules més joves del fel·lema, que encara no han completat la suberificació i en cèl·lules que ja tenen la paret suberitzada però que encara estan vives (Figura 30, C i E). En les mateixes cèl·lules que presenten el precipitat blau ja s'hi pot observar fluorescència deguda a la presència de suberina en les seves parets cel·lulars, tot i que menys intensa que la del fel·lema madur. Cal destacar que s'ha observat que l'activitat del promotor d'*StNAC103* és molt evident en tubercles joves o frescos mentre que en els tubercles vells -un mínim de dos mesos en la planta *in vitro*- no s'hi ha trobat activitat del promotor.

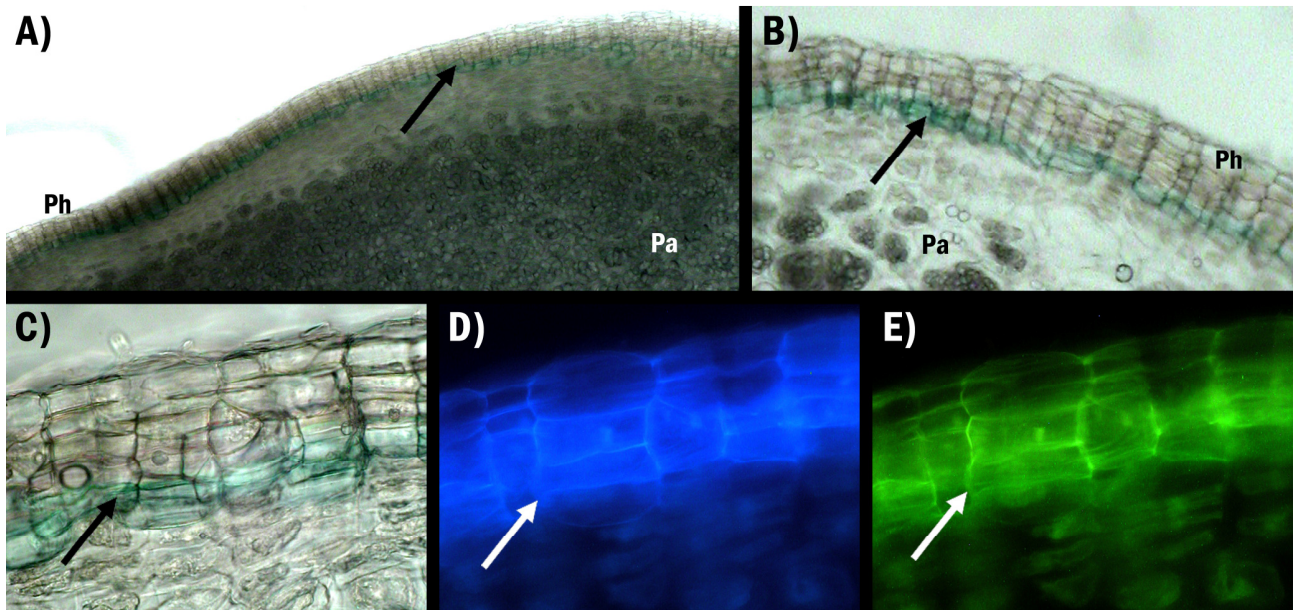


Figura 30 Patró de tinció per GUS al periderma del tubercle. Micrografies de seccions de tubercles, que contenen la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP*. A) Aspecte general on s'indica el senyal GUS a les capes més basals del fel-lema, B) a E) detalls tenyits del periderma que mostren la localització de la senyal GUS (C) comparat amb l'autofluorescència de la suberina (D i E). La fletxa indica una cèl·lula tenyida i amb les parets suberitzades, tal com es pot apreciar per mitjà de la fluorescència emesa per la suberina a la paret cel·lular. C) Imatge de camp clar. D) Fluorescència: excitació a $\lambda=[330;380]$ nm; observació a $\lambda>420$ nm i E) Fluorescència: excitació a $\lambda=[455;490]$ nm; observació a $\lambda>530$ nm. (Ph: fel-lema; Pa: parènquima).

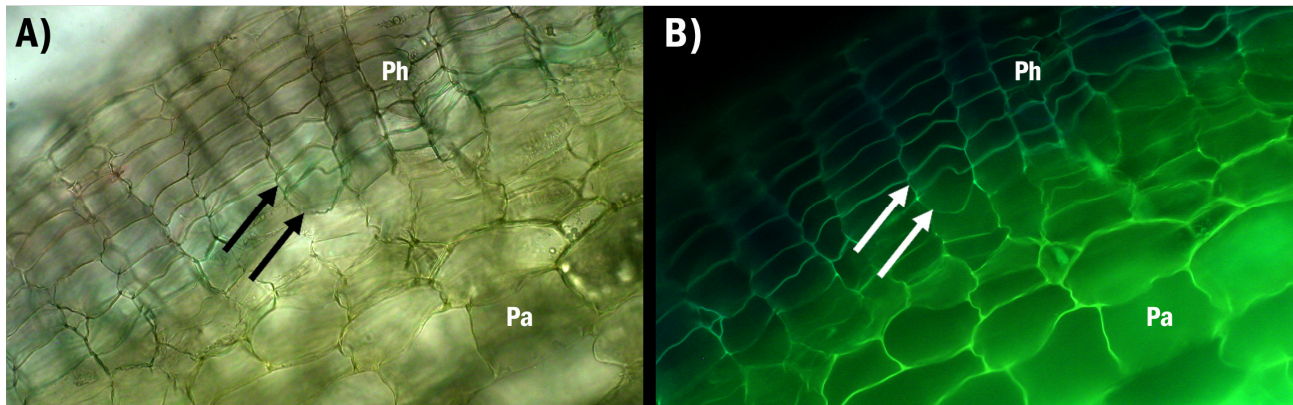


Figura 31 Localització de l'activitat del promotor d'*StNAC103* al fel-lema. Secció tenyida per β -Glucuronidasa i berberina. A) Observació amb camp clar. B) Sota la llum ultraviolada (excitació a $\lambda=[330;380]$ nm; observació a $\lambda>420$ nm). La fluorescència turquesa de la berberina és específica de la suberina. Les fletxes indiquen cèl·lules amb activitat GUS (A) amb les parets suberificades (B). (Ph: fel-lema; Pa: parènquima).

La localització de l'expressió dins el fel·lema, en la capa basal, es pot apreciar de manera especial a la Figura 32, que correspon a un fel·lema que es va desprendre del tubercle en el moment de realitzar el tall a mà alçada. La coloració blavosa es detecta en el citoplasma de les cèl·lules més joves del fel·lema, que ja presenten clarament autofluorescència en els dos rangs d'excitació observats. La suberina es detecta amb fluorescència blava i el marcatge de GUS co-localitza en aquestes cèl·lules que ja tenen les parets cel·lulars clarament suberitzades. A la Figura 31, a més, es pot observar una tinció amb berberina, que permet una diferenciació cromàtica de la suberina en condicions de fluorescència. Aquesta anàlisi es va comprovar en les línies 2, 6 i 8. L'autofluorescència de la suberina i la lignina no van permetre la detecció de l'activitat del promotor mitjançant GFP.

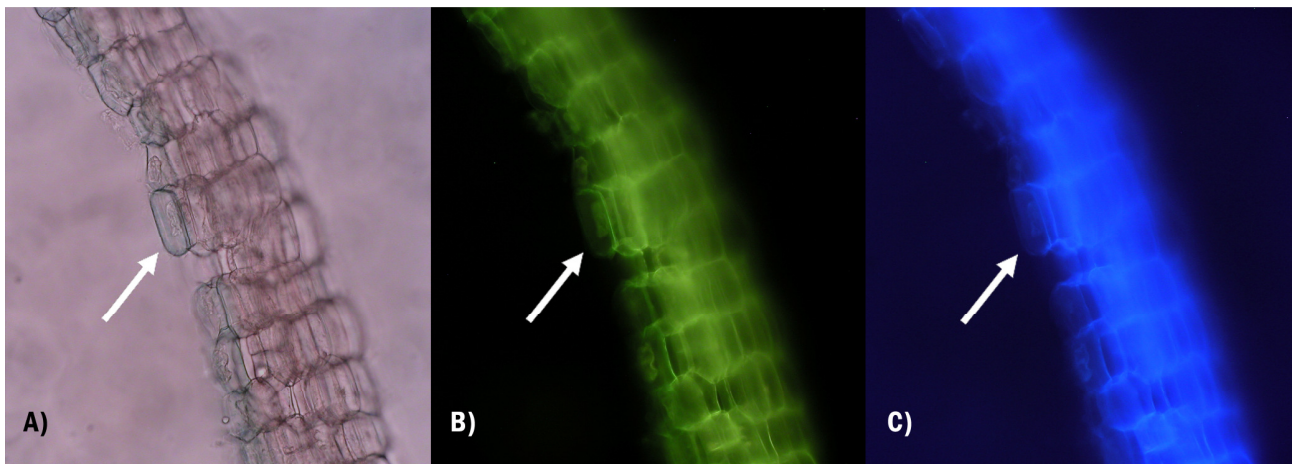


Figura 32 Fragment de fel·lema aïllat per observar l'activitat del promotor. Tenyit per GUS, amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* (A) Imatge de camp clar on s'ha dut a terme la tinció per β -Glucuronidasa. B) S'ha obtingut amb una excitació a $\lambda=[455;490]$ nm; observació a $\lambda>530$ nm i C) amb una excitació a $\lambda=[330;380]$ nm; observació a $\lambda>420$ nm.

En els tubercles de plantes transformades amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP*, a més, macroscòpicament s'observa una gran intensitat del senyal a nivell de les lenticel·les, tal i com es pot veure

en la Figura 33 (A). En secció transversal es detecta marcatge just a la base de la lenticel·la, en cèl·lules del fel·logen de lenticel·la (Figura 33, C i D). Aquests resultats s'han obtingut per a les línies 2, 6 i 8.

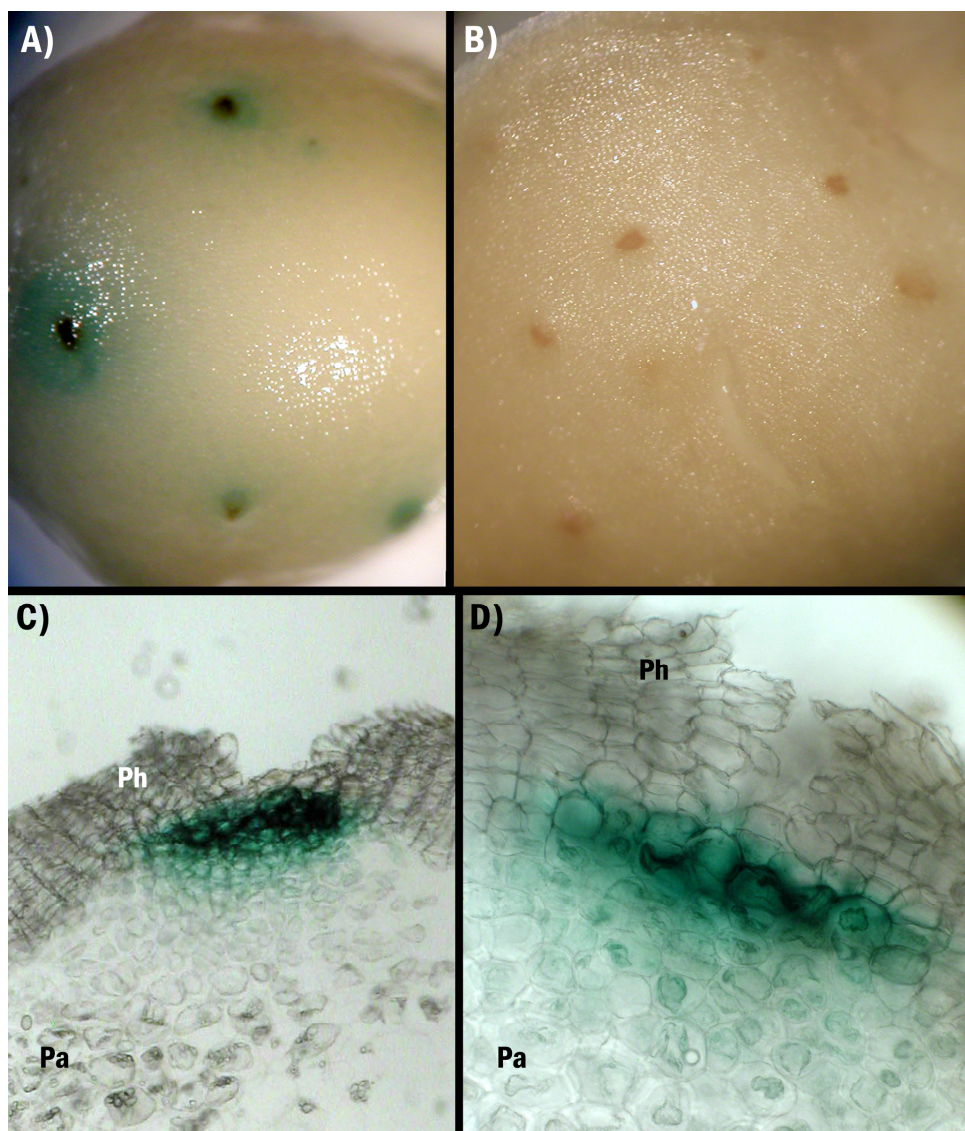


Figura 33 Patró de tinció per GUS al periderma lenticel·lar. Revelat per mitjà d'activitat GUS en tubercles que contenen la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* A) i B) Imatges de tubercles obtingudes a través de lupa binocular. A) tubercle transformat, B) planta no transformada. C) i D) Seccions de dues lenticel·les observades amb microscòpia de camp clar. (Ph: fel·lema; Pa: parènquima).

També es va realitzar un marcatge GUS en arrels de les línies transgèniques *ProStNAC103::GUS-GFP*. Les arrels primàries contenen suberina que es diposita en les barreres formades per l'endoderma, una capa unicel·lular situada entre el còrtex i el cilindre central, i l'exoderma, que es diferencia a nivell d'epidermis i subepidermis. A més, en les regions madures de l'arrel comença molt aviat l'activitat cambial, amb la formació de càmbium i fel·logen. L'activitat del fel·logen dóna lloc a la formació d'un periderma amb varies capes de cèl·lules de fel·lema amb les parets suberitzades, que protegeix de la deshidratació els teixits resultants del creixement secundari. La tinció GUS de les arrels de les plantes portadores de la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* revela que la senyal blava indicadora de l'activitat del promotor té lloc específicament a nivell de les capes suberificades de l'arrel. A la Figura 34 s'hi observa un tall transversal d'arrel -a una alçada aproximada de 70 mm de l'àpex- de planta crescuda *in vitro*, de 21 dies d'edat. Per tal de poder orientar bé el tall, aquestes arrels es van incloure en agar després de la incubació amb el substrat cromogènic de GUS. Paral·lelament a l'observació en camp clar (Figura 34, B) es va observar la fluorescència obtinguda després de tenyir amb berberina (Figura 34, A). En la micrografia de camp clar s'observa tinció blava -feble- en dues capes concèntriques, una més exterior i l'altra més interior que envolten els feixos vasculars (Figura 34, B). La tinció amb berberina és específica de suberina i lignina i, a la imatge A, s'aprecia que les cèl·lules suberitzades de l'exoderma i els vasos lignificats del xilema presenten una fluorescència verda. El marcatge amb berberina també permet identificar la banda de Caspary (Ca, Figura 34, A) que es troba a l'endoderma (En). Comparant la micrografia de camp clar amb la resta, s'observa que el marcatge GUS es troba a l'exoderma i a l'endoderma. Aquests resultats s'han obtingut amb un sol esdeveniment de transformació.

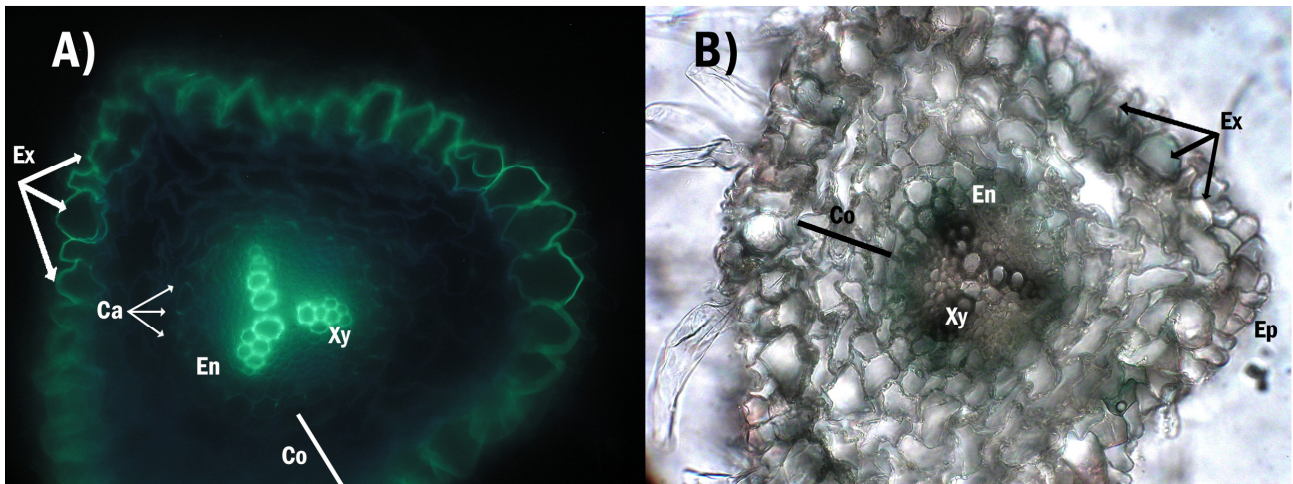


Figura 34 Patró de tinció per GUS en arrel de patata transformada amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* (línia 2). A) Secció transversal tenyida amb berberina que mostra la fluorescència de les parets suberitzades (excitació a $\lambda=[455;490]$ nm; observació a $\lambda>530$ nm). B) micrografia de camp clar amb tinció per GUS. (Ex: exodermis; En: endodermis; Ca: bandes de Caspary; Co: parènquima cortical o còrtex; Xy: xilema).

Expressió en teixits cicatricials

La deposició de suberina és imprescindible per a la formació de la barrera hidrofòbica en el teixit cicatricial. Per tal de determinar si el gen *StNAC103* s'indueix per ferida i quina evolució té l'acumulació de transcrit, es van analitzar els nivells de missatger durant dos períodes, de 6 i 5 dies després de ser ferida en tubercle i fulla de patata, respectivament. A més a més també es va analitzar si la ferida podia induir expressió del gen en una fulla sistèmica. Paral·lelament també es va analitzar l'acumulació relativa de transcrit (RTA) de dos gens relacionats amb la síntesi de suberina i ceres: *CYP86A33* (Serra *et al* 2009b) i *FHT* (Serra *et al* 2010b). El gen *CYP86A33* (nombre d'accés EU293405)³ codifica per una ω -hidroxilasa d'àcids grassos, està implicat en la formació dels compostos majoritaris de la suberina (ω -hidroxidiàcids i diàcids), i tal i com s'ha comentat en la Introducció participa en la funció barrera del periderma i en l'organització lamel·lar de la suberina (Serra *et al* 2009b). La proteïna *FHT* (nombre d'accés FJ825138)³ és una *fatty ω -hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase* implicada en l'esterificació de compostos alifàtics i aromàtics (èsters

³ A la base de dades EMBL/GenBank

de ferulat) de suberina i ceres, molt rellevant en la barrera davant la deshidratació i en l'organització tissular del fel·lema (Serra *et al* 2010b).

El tubercle reacciona a l'arrossegament mecànic del periderma o a qualsevol altre tipus de ferida mitjançant el desenvolupament del periderma cicatricial. Aquest és similar en composició i estructura al periderma natiu i segueix un procés de maduració semblant (Lulai i Freeman 2001). Per contra, el periderma cicatricial és més permeable a l'aigua i les ceres es troben enriquides amb alcohol ferulats (Schreiber *et al* 2005). Es va dur a terme el perfil temporal d'acumulació de transcrit durant la cicatrització de la ferida en tubercle de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (cv Monalisa) -adquirit a un distribuïdor comercial- amb dues rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques. Cada rèplica biològica incloïa tres discs. Es van escindir discs de 13 mm de diàmetre i 3 mm d'alçada amb un perforador i es van incubar en una placa de Petri a la foscor i amb l'atmosfera saturada d'humitat per permetre el desenvolupament de la capa de tancament i el periderma cicatricial. Els períodes d'incubació van ser de 0, 1, 4, 24, 48, 72 i 144 hores de ser ferida. En el cas de la rèplica 1, l'extracció d'RNA de la mostra d'1 hora va fallar i per tant no es va poder analitzar.

En el cas de les fulles, aquestes desenvolupen solament una capa de tancament, com a teixit suberitzat d'aïllament respecte el medi. La ferida de fulla es va realitzar en una fulla tendra per cada patatera amb un raspall de gos. Es van utilitzar les patates varietat Désirée que estaven creixent a la cambra visitable. Pel que fa a la fulla els temps de ferida han estat 0, 6, 12, 24, 48, 72 i 120 hores.

Perfil temporal d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en teixits cicatricials

En el **tubercle ferit**, es van utilitzar dues rèpliques biològiques i en totes dues es va observar com després de la ferida es donava un increment en l'RTA dels gens analitzats. Per a *StNAC103*, que no s'expressa en el parènquima, l'acumulació relativa de transcrit es comença a fer patent a les 24 hores després de la ferida i va en augment almenys fins a les 144 hores. Aquest comportament es pot observar de manera semblant en les dues rèpliques biològiques (Figura 35). El patró de *CYP86A33* és similar al d'*StNAC103*, i també es detecta acumulació relativa de transcrit a partir de les 24 hores de la ferida. En canvi, el transcrit d'*FHT* es comença a detectar a les 4 hores des de la ferida. Quan es comparen els perfils d'RTA dels diferents gens, s'observa que els valors d'RTA d'*StNAC103* augmenten progressivament fins a les 144 h, mentre que en els

gens *CYP86A33* i *FHT* s'observa un màxim d'acumulació entre les 48 i 72 hores. Després s'estabilitzen els valors fins a les 144 h des de la ferida.

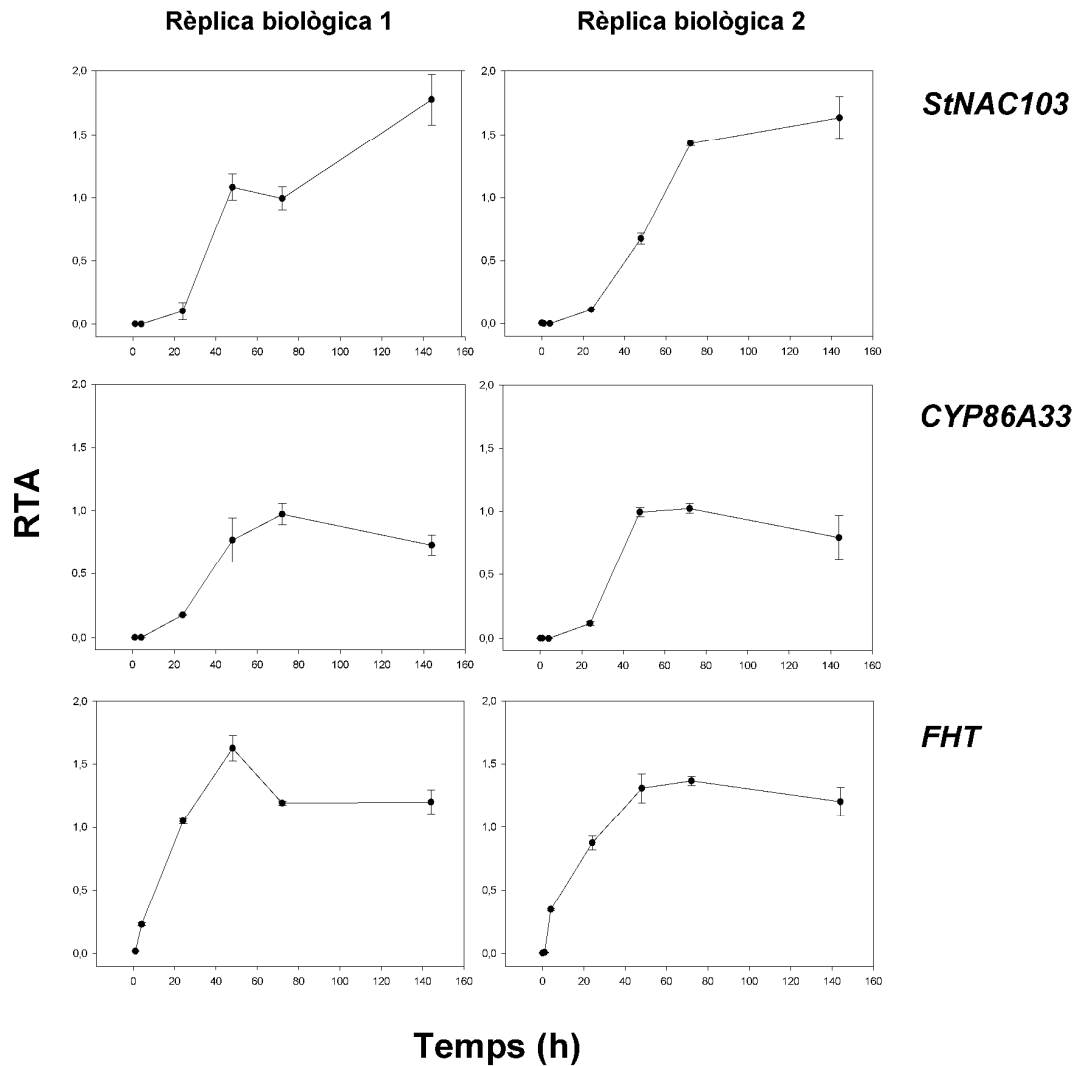


Figura 35 Evolució de l'acumulació relativa de transcrit d'*StNAC103*, *CYP86A33* i *FHT* en tubercle ferit. L'acumulació relativa de transcrit es va obtenir per mitjà d'RT-PCR a temps real, amb l'ús com a gen de referència d'*EF1α*. D'esquerra a dreta es troben les dues rèpliques biològiques i de dalt a baix els tres gens analitzats per cada rèplica. Observi's com, a partir de la ferida s'indueix l'acumulació de transcrit d'*StNAC103*. Cal apreciar que *FHT* inicia la seva expressió abans que la de *CYP86A33* i *StNAC103*.

Pel que fa a la cicatrització de **fulla ferida**, el disseny experimental consta de tres rèpliques biològiques i set punts temporals per cada rèplica biològica. Les fulles recollides a cadascun dels diferents punts temporals provenien cadascun d'una planta diferent, per tant, cada rèplica biològica correspon en realitat, a la resposta de set plantes diferents. D'aquesta manera, s'evitava l'efecte acumulatiu de ferida que representa recol·lectar una fulla a cada temps de mostreig de la mateixa planta. També s'aconseguia una major precisió en l'elecció de fulles d'igual mida i edat. L'inconvenient d'aquest disseny experimental és que s'usaven 7 plantes diferents per a cada rèplica biològica -una per cada temps de ferida- i això podia donar molta variabilitat dins la mateixa mostra i entre mostres. Els valors d'RTA d'*StNAC103* per les tres rèpliques biològiques es troben representats a les Figures 36 i 37. En les tres rèpliques biològiques s'observa que la ferida indueix l'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en fulla, un teixit a on *StNAC103* no s'expressa. Tot i que el perfil d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* és diferent per cada rèplica biològica, l'acumulació de transcrit s'observa a partir de com a mínim, les 24 hores de ser ferida (Figura 36), la qual cosa suggereix que no és un gen de resposta primària i que per tant, altres gens reguladors haurien d'actuar prèviament a l'*StNAC103*. L'anàlisi de l'acumulació de transcrit per *CYP86A33* i *FHT* evidencia també que ambdós gens s'indueixen per ferida, tot i que presenten diferents perfils per les tres rèpliques biològiques, de la mateixa manera que *StNAC103*. Quan es comparen els perfils d'acumulació de transcrit de cada gen dins cada rèplica biològica s'observa que el transcrit de *CYP86A33* segueix un patró similar al d'*StNAC103* (Figures 36 i 37) i el d'*FHT* comença a acumular-se de manera encara més primerenca. Tal i com es pot observar a la Figura 37 el transcrit d'*FHT* ja es pot detectar en el primer punt de la sèrie temporal, a les 6 hores després de la ferida (Figura 37). El comportament dels transcrits dins cada rèplica biològica mostra que a la fulla ferida es dona coexpressió d'*StNAC103* amb *CYP86A33* i que *FHT* s'expressa abans, tal com s'ha vist prèviament en el tubercle ferit. La rèplica 2 presenta uns valors d'RTA majors i un màxim d'acumulació de transcrit dels tres gens a 24 hores, cosa que no passa amb les rèpliques 1 i 3. Si es té present que en cada punt temporal d'una rèplica biològica hi ha mostres que provenen de plantes diferents i que la ferida d'aquestes fulles es va realitzar en plantes cultivades en terra, és raonable pensar que la mostra del punt 24 hores en aquesta rèplica 2 podria estar afectada per algun factor exogen independent de la ferida induïda per l'investigador, com per exemple l'atac d'un insecte.

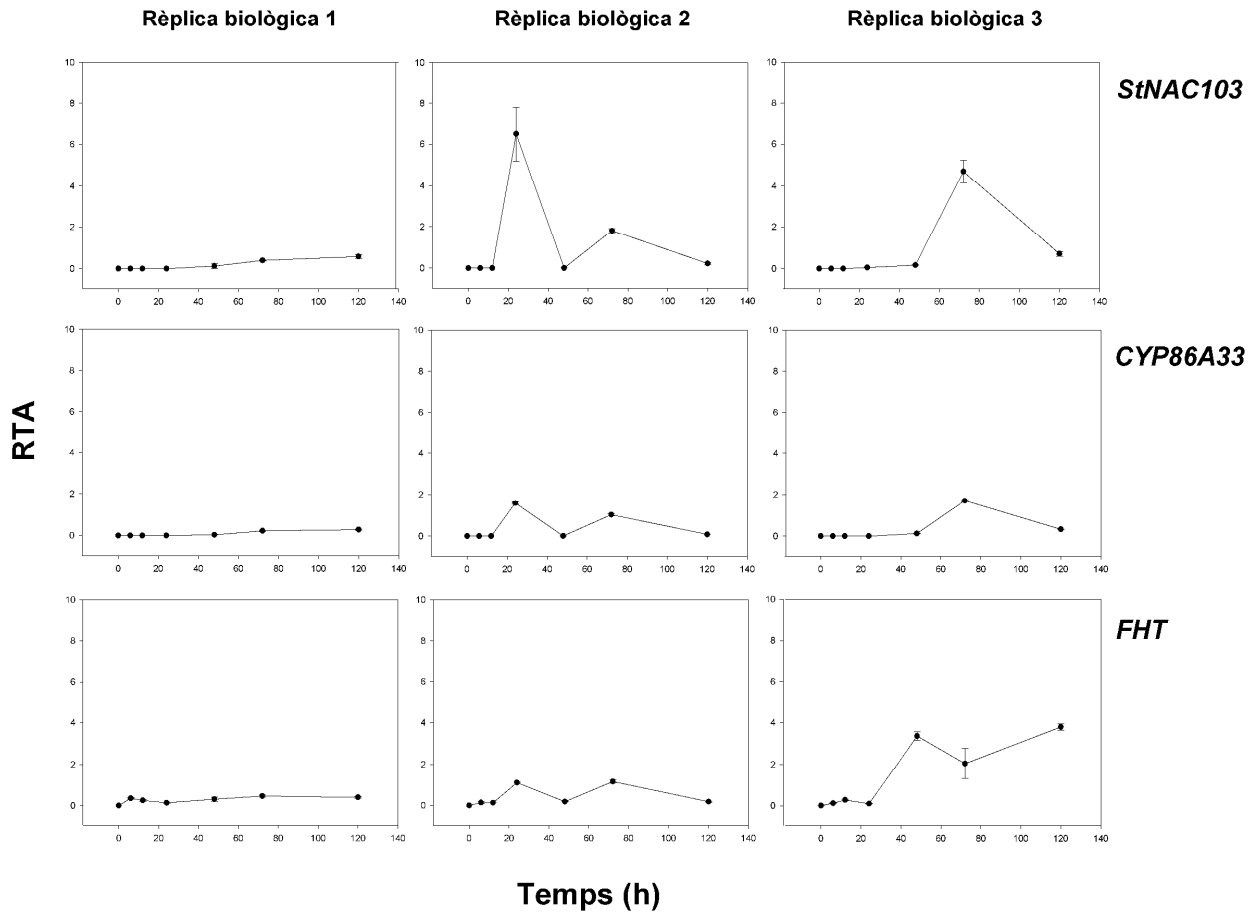


Figura 36 Acumulació relativa de transcrit en fulla ferida en una escala temporal. L'acumulació relativa de transcrit es va obtenir per mitjà d'RT-PCR a temps real, amb l'ús com a gen de referència d'*EF1 α* (*Elongation Factor 1 α*). D'esquerra a dreta es troben les diferents rèpliques biològiques i de dalt a baix els diferents gens analitzats per cada rèplica biològica.

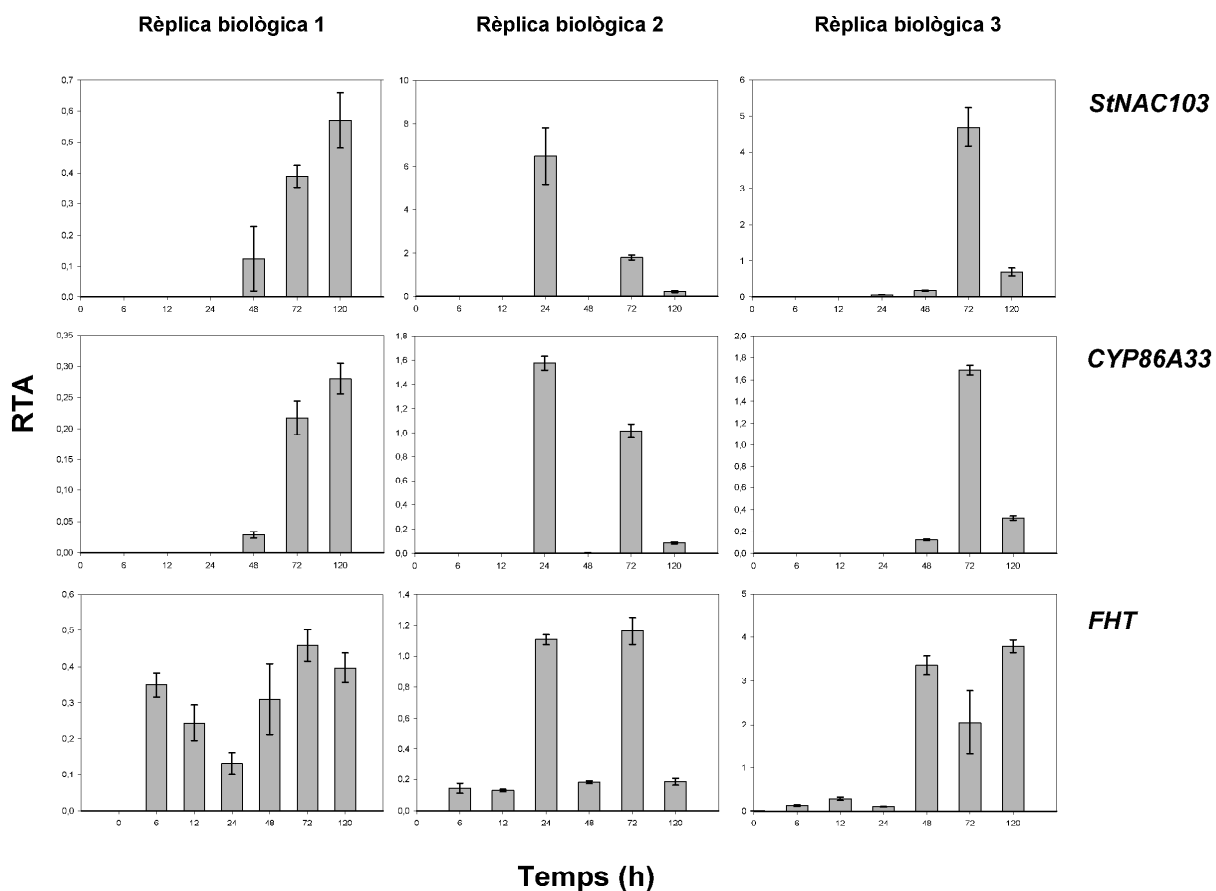


Figura 37 Acumulació relativa de transcrit en fulla ferida en diagrama de barres. La representació permet apreciar que el patró d'*StNAC103* es correspon amb el de *CYP86A33* però l'expressió d'*FHT* comença abans. D'esquerra a dreta es troben les diferents rèpliques biològiques i de dalt a baix els diferents gens analitzats per cada rèplica. L'acumulació relativa de transcrit es va obtenir amb l'ús com a gen de referència d'*EF1α*. Cal notar que al moment inicial cap dels tres gens es troba induït i que la ferida induïx l'acumulació de transcrit dels tres gens. El primer que s'indueix és *FHT* mentre *StNAC103* i *CYP86A33* ho fan amb posterioritat.

Singh *et al* (2013) troben en una varietat de patata diferent a les esmentades en aquest treball – anomenada Kufri Sutlej- que *StNAC103* s'expressa tant a fulla jove com a fulla vella. Donat que en la varietat Désirée no es detecta expressió a fulla del gen, ni per *Northern blot* (Soler 2008), ni mitjançant PCR a temps real (Figura 29), es va considerar oportú estudiar la ferida en fulla en la subespècie *andigena*. A

més, i per tal de saber si la fulla no ferida d'una planta ferida podia induir l'expressió del gen, es va analitzar l'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en fulla no ferida de planta no ferida, fulla ferida i fulla no ferida de planta ferida (fulla sistèmica). Tal i com es pot observar en la Figura 38, en la subespècie *andigena* *StNAC103* no s'expressa a fulla de planta sense ferir, mentre que en la fulla ferida, després de 72 hores, hi ha un augment evident en l'acumulació de transcrit. Pel que fa a la fulla sistèmica, s'observa acumulació evident de transcrit, però els seus nivells són inferiors que en la fulla ferida. Aquests resultats mostren que la senyal de ferida és detectada a parts distals de la zona lesionada i indueix l'acumulació del missatger d'*StNAC103*.

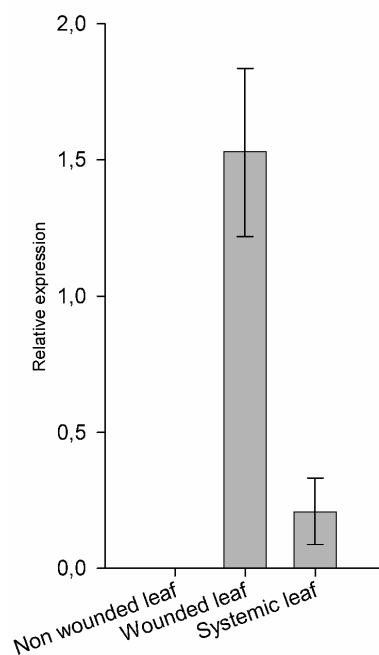
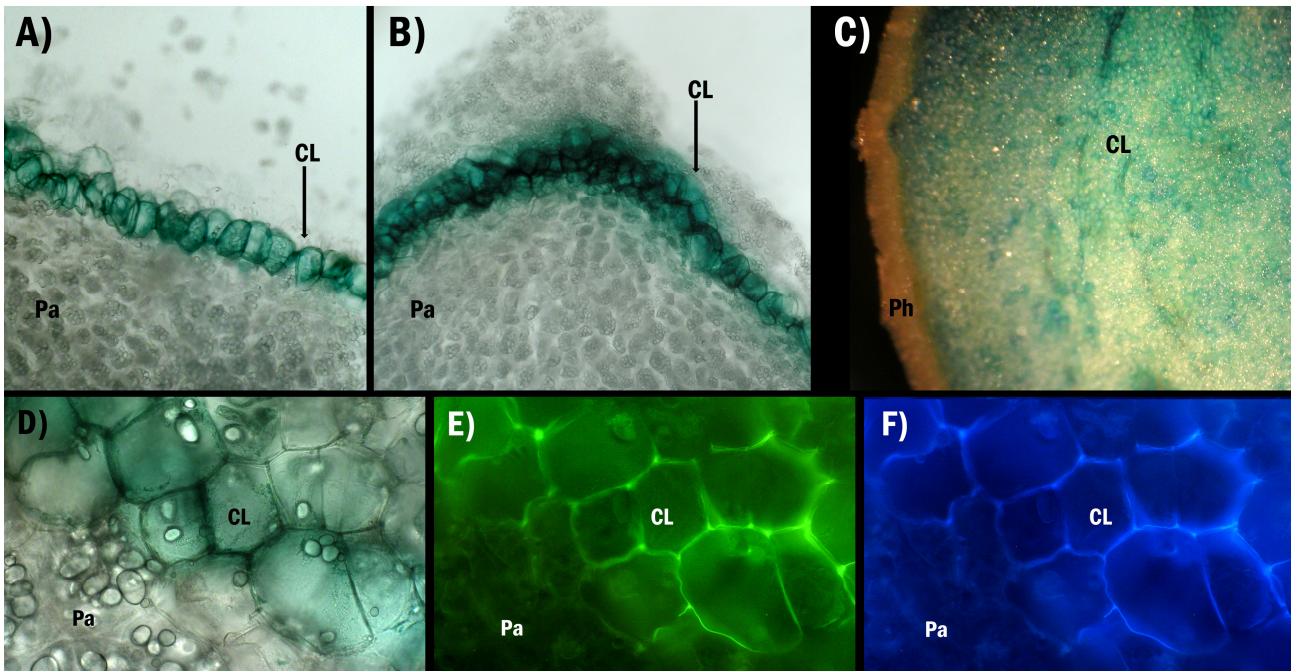


Figura 38 Abundància Relativa de Transcrit d'*StNAC103* en fulla ferida, en relació al gen *aprt*. mitjançant RT-PCR a temps real. La fulla sistèmica correspon a fulla no ferida de planta ferida. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard de l'abundància de missatger en cada teixit ($n_{\text{Fulla no ferida, Fulla ferida, Fulla sistèmica}}=2$).

Figura 39 Patró de tinció per GUS en tubercle ferit. Imatges de tubercle ferit transformat amb la construcció *ProStNAC103::GUS-GFP* (línia 2). El revelat de l'activitat GUS es va realitzar després de 48 h de ser ferida o de cicatrització. A) i B) Micrografies de camp clar on s'aprecia tenyida la capa de tancament (CL). A B) s'aprecia que la capa de tancament es pot originar sota la superfície del tall. C) Superfície d'un tall deixat cicatritzar durant 48 h, tenyit i observat amb lupa binocular. S'hi aprecia la capa de tancament i el fel·lema (Ph). D) a F) Detall de la capa de tancament de la ferida en tubercle, adjacent al parènquima (Pa). D) correspon a microscòpia de camp clar, i E) i F) a fluorescència. E) s'ha obtingut amb una llum d'excitació a $\lambda=[330;380]$ nm; observació a $\lambda>420$ nm i F) amb una excitació a $\lambda=[455;490]$ nm; observació a $\lambda>530$ nm.



Anàlisi de l'activitat del promotor d'*StNAC103* en tubercle ferit

Tenint en compte que el transcrit del gen *StNAC103* s'indueix per ferida tant en tubercle com en fulla, es va voler determinar la ubicació cel·lular de l'activació del promotor en tubercle ferit. Els tubercles eren escindits de la planta, tallats al llarg de l'eix longitudinal i posteriorment preservats durant 48 hores en una cambra humida per permetre la formació d'un periderma cicatricial. Es va observar expressió d'*StNAC103* circumscrita en les capes de cèl·lules més externes en relació al pla de ferida (Figura 39), com es pot observar en els talls transversals (A i B) i a la superfície del tall (C). Aquesta expressió s'ha detectat tant a les 48 com a les 72 h després de la ferida, i es limita a la capa de tancament (*closing layer*) que es forma després de la ferida (Artschwager 1927). Aquesta capa de tancament deriva del parènquima i es forma a través d'un procés de suberització, depleció d'amilooplastos i de mort cel·lular. Un detall més ampliat d'aquesta capa de tancament es pot apreciar en la Figura 39 (D a E). La mateixa secció s'observa en camp clar i fluorescència. En aquesta imatge es detecta que la localització de l'activitat del promotor es troba en el citoplasma de les cèl·lules de la capa de tancament, les cèl·lules de la qual ja estan mancades d'amilooplastos i amb les parets cel·lulars suberitzades. Aquests resultats s'han detectat en les línies 2 i 6 que corresponen a diferents esdeveniments de transformació.

3.4. Discussió

Expressió d'*StNAC103* i els teixits suberitzats

L'augment de suberina i ceres en les línies silenciades per *StNAC103* suggereix que *StNAC103* és un gen repressor del procés de suberització. Paral·lelament a aquests resultats es detecta acumulació de transcrit en òrgans suberitzats, bé sigui de manera constitutiva -tubercle i arrel-, bé induïda, com és el cas del teixit cicatricial. En la mateixa línia d'evidències s'observa l'activació del promotor en cèl·lules basals de fel·lema, la capa de tancament de la ferida i dèbilment en l'endoderma i exoderma de l'arrel. La coherència de resultats entre acumulació de transcrit i activació del promotor evidencia que el fragment utilitzat per obtenir les plantes transgèniques disposa dels elements reguladors en *cis* necessaris per a l'activació del gen i en conseqüència que aquestes línies transformades poden ser molt útils per identificar elements reguladors en *cis* rellevants i aprofundir en els factors que intervenen en la seva regulació. Les dades consultades *in silico* també avalen aquesta localització específica, no només en patatera, que s'expressa en pela de tubercle i arrel, sinó també per l'ortòleg d'*Arabidopsis*, que s'expressa en els teixits suberitzats de l'arrel, la llavor i teixit en creixement secundari. Tal i com s'ha comentat en la Introducció d'aquest capítol, l'ortòleg d'*StNAC103* de surera també té major acumulació de transcrit en teixits amb màxims nivells de suberització, ja que el gen està induït a fel·lema respecte a embrió somàtic i respecte a xilema (Soler *et al* 2007) i en el fel·lema presenta un màxim de missatge el Juny, quan hi ha major producció de suro (Soler *et al* 2008). Contràriament als resultats d'acumulació de transcrit d'*StNAC103* obtinguts tant en fulla ferida com sistèmica, sorprèn que Massa *et al* (2011) no trobin inducció del gen a *S. tuberosum* grup Phureja al cap de 24 hores de la ferida, ni en fulla ferida ni en fulla sistèmica. Si bé però, val la pena remarcar que la primera inducció d'*StNAC103* per ferida a Désirée es va obtenir entre les 24 i 48 hores de ser ferida. En coherència amb els resultats d'inducció d'*StNAC103* per ferida que es presenta, convé esmentar que es va analitzar també l'activació del promotor en fulla transformada amb *ProStNAC103::GUS-GFP* en un treball paral·lel i que després de 72 hores de ser ferida, es va observar activació del promotor al voltant de la zona ferida (Garrote Gironès 2013).

Si tenim en compte que *StNAC103* s'indueix per ferida i que aquesta inducció es detecta també a la fulla sistèmica, sorprèn que l'ortòleg d'*Arabidopsis* no s'indueixi per àcid jasmònic segons l'eFP Browser. Aquests resultats suggereixen que *StNAC103* s'indueix per ferida de forma independent d'àcid jasmònic. Tenint en compte que s'ha vist recentment que en tubercle ferit, el tractament amb ABA té capacitat per induir acumulació del missatge d'*StNAC103* a les 48 hores de ser ferida (Garrote Gironès 2013), que el tractament amb ABA dóna lloc a un augment de la suberització (Lulai *et al* 2008) i que la percepció d'ABA és necessària per a la inducció de l'inhibidor de proteïnasa per ferida (Carrera i Prat 1998), és possible que

l'ABA tingui un paper rellevant en la senyalització de ferida i inducció d'*StNAC103*. En la mateixa línia d'evidències, l'ortòleg d'aquest gen a *Arabidopsis* dona hipersensibilitat a l'ABA i sembla que mimetitzi efectes d'estrès o ABA, ja que la inducció del gen inhibeix la germinació al igual que passa en presència de sal o l'ABA (Coego *et al* 2014).

La localització de l'activitat del promotor d'*StNAC103* en arrels de cultiu *in vitro* coincideix amb la dels gens de biosíntesi de suberina i ceres d'*Arabidopsis*, com s'ha observat en els casos de *CYP86A1/Horst* (Höfer *et al* 2008), *ASFT* (Molina *et al* 2009), *CYP86B1* (Compagnon *et al* 2009), *FAR* (Domergue *et al* 2010) i *FACT* (Kosma *et al* 2012) que té lloc a l'endoderma. Si bé però, val la pena remarcar que l'activitat del promotor en l'endoderma és molt dèbil i que l'anàlisi de l'activitat del promotor d'*StNAC103* en arrels de cultiu hidropònic ha mostrat una expressió clara del promotor en el primordi de l'arrel lateral i el meristema apical de l'arrel (Garrote Gironès 2013). Aquests resultats suggereixen per tant, que l'activació del promotor d'*StNAC103* a nivell tissular no és concomitant amb la dels gens de suberina com per exemple *FHT*, el promotor del qual s'activa de forma evident a endoderma i exoderma (Boher *et al* 2013) tant en cultiu *in vitro* com en cultiu hidropònic. Recentment s'ha estudiat el comportament de l'endoderma durant la formació de les arrels laterals i s'ha observat que les cèl·lules de l'endoderma que recobreixen els primordis laterals de l'arrel perden volum, canvien de forma i renuncien a la funció barrera per donar pas a les arrels laterals emergents (Vermeer *et al* 2014). Així doncs aquesta pèrdua de barrera hidrofòbica de l'endoderma durant la formació de les arrels laterals juntament amb l'activació evident del promotor d'*StNAC103* als primordis de les arrels laterals, recolzen de nou el paper repressor d'*StNAC103* pel que fa a la biosíntesi de suberina i ceres i suggereixen un paper d'aquest gen en la formació de les arrels laterals.

És interessant remarcar que el promotor d'*StNAC103* s'activa al fel·logen lenticel·lar, de la mateixa manera que el promotor d'*FHT* (Boher *et al* 2013). Les lenticel·les són àrees especials del periderma, crucials per a la regulació d'intercanvi de gasos. La regulació d'intercanvi de gasos a través de les lenticel·les té lloc a través d'estructures que impliquen activitat del fel·logen i requereixen síntesi de suberina. Així doncs, la suberificació restringeix la difusió de gasos mentre que l'engrandiment de l'àrea de la lenticel·la per mitjà de la proliferació cel·lular, augmenta aquesta difusió (Lendzian 2006). En aquestes lenticel·les és probable que en determinats moments convingui un elevat creixement cel·lular, pel que les citoquinines podrien tenir un paper important i al mateix temps, podrien regular l'expressió d'*StNAC103*, el qual inhibiria l'expressió de gens biosintètics de la suberina.

Co-expressió d'*StNAC103* amb gens de biosíntesi de suberina durant la cicatrització

Pel que fa a l'anàlisi *in silico* de gens coexpressats amb l'ortòleg en *Arabidopsis ANAC058*, s'evidencia que hi ha varis gens relacionats amb la síntesi de suberina i ceres com *FAR4 i 5*, *CYP86A1* i *CYP86B1*, *FACT*, *LTP1*, *5 i 7* i els transportadors del tipus ABC. En l'anàlisi del transcriptoma de les línies silenciades NSC, s'observa, en el primer lot, inducció de *CYP86A1*, *CYP86B1*, *FAR5*, *LTP1* i varis transportadors del tipus ABC-2 entre altres gens relacionats amb la síntesi de suberina i ceres (Mercè Figueras, comunicació personal). Val la pena comentar també que en un segon lot i comparant NSC i NSE, s'observa l'activació de la via de síntesi d'àcids grassos de forma clara en les dues construccions.

ANAC058 es coexpressa també amb un conjunt de gens reguladors, entre ells dos gens de la família NAC, i diversos MYB (14, 67 i 93), amb els quals podria teixir una xarxa de regulació/autoregulació similar a les que es proposen en els estudis de Hussey *et al* (2013), Hickman *et al* (2013) i Nuruzzaman *et al* (2013). En referència als gens de la família MYB esmentats, hi ha diverses evidències que els relacionen amb *ANAC058*, pel que fa al tipus d'estímul que n'indueixen l'expressió. Així, s'ha trobat que tots ells excepte *MYB67*, per al qual no hi ha dades, s'expressen a l'arrel i en resposta a àcid salicílic (Plant Transcription Factor Database, de Pérez-Rodríguez *et al* (2009)), la qual cosa els podria vincular amb situacions de suberització i resposta a patògens. *MYB14* i *MYB93* responen a auxines, *67* i *93* a ABA, i *MYB14* a l'àcid jasmònic. *MYB14* respon al fred, l'estrès, la ferida i l'etilè. Altres dades que els poden relacionar amb processos de suberització són que, pel que fa a la localització, *MYB 14* i *93* s'expressen també a l'hipocòtil d'*Arabidopsis*, que és un dels teixits suberitzats de la planta. A més, el probable ortòleg d'*AtMYB14* de *Lotus japonicus* (*LjMYB14*) està relacionat amb la producció de cumaroil-CoA, precursor de la via general dels fenilpropanoides (General Phenylpropanoid Pathway), i la seva sobreexpressió provoca un augment de l'expressió d'alguns gens de la GPP, de la via dels isoflavonoides i UDP-glicosiltransferases (Shelton *et al* 2012). Si bé però, tant al primer lot com al segon lot d'RNA-seq no s'ha trobat expressió diferencial d'aquests MYBs. En coincidència amb NSC i NSE en el segon lot, es dona regulació positiva de *MYB12*, un gen que està implicat en la regulació de flavonoides (Mehrtens *et al* 2005, Luo *et al* 2008, Adato *et al* 2009).

Per tal de valorar la correlació del perfil d'acumulació de transcrit del gen *StNAC103* amb dos gens de funció demostrada en la biosíntesi de la suberina (*FHT* i *CYP86A33*), es va induir cicatrització en tubercle i fulla de patata. S'observa que el primer gen que s'indueix és *FHT*, ja que es detecta acumulació de transcrit a les 4 hores de ferida en tubercle i a les 6 hores de ferida en fulla. Pel que fa a *StNAC103* i *CYP86A33*, en tubercle ferit l'expressió s'indueix ja a les 24 hores, mentre que en fulla ferida la inducció d'aquests dos

gens es dona com a molt tard a les 48 hores. El fet que *StNAC103* s'indueixi més tard que *FHT* i al mateix temps que *CYP86A33* descarta la possibilitat que sigui un regulador positiu d'aquests dos gens. Sorprenentment, les anàlisis del transcriptoma de les línies silenciades de forma conservada va mostra en un primer lot inducció d'*FHT* i *CYP86A33* en les línies silenciades. Així doncs, en el nostre cas la co-expressió d'*StNAC103* amb *FHT* i *CYP86A33* tindria per finalitat reprimir la síntesi de la suberina i ceres quan aquesta s'ha completat. Diversos estudis han demostrat que la deposició de suberina es dona com a mínim durant els set primers dies després de la ferida (Yang i Bernards 2007, Lulai *et al* 2008), i durant els primers dies de cicatrització s'acumulen els compostos aromàtics, mentre que a partir del cinquè dia des de la ferida s'acumulen els compostos alifàtics (Yang i Bernards 2007). Per tant, el fet que el repressor de suberina s'acumuli tan prematurament, pot indicar que tot i que s'activa el gen i el transcrit s'acumula, es dona regulació traduccional, post-traduccional o d'activitat de la proteïna.

A més a més, el perfil d'acumulació de transcrit d'*FHT* i *CYP86A33* concorda amb resultats obtinguts prèviament per altres autors, en tubercle de patata, per a alguns gens i proteïnes implicades en la biosíntesi de suberina. Es va veure que l'activitat peroxidasa aniónica augmentava 16 vegades el sisè dia després de la ferida i que tant l'activitat com la proteïna presentaven un augment més gran entre el quart i el sisè dia des de la ferida (Espelie *et al* 1986). Aquest enzim podria estar implicat en la polimerització dels compostos aromàtics de la suberina (Bernards 2002). Un altre enzim que podria estar situat al principi de la via dels fenilpropanoides i, per tant, implicat en el domini aromàtic de la suberina (Bernards 2002), és la PAL (*Phenylalanine Ammonia Lyase*). Es va detectar activitat PAL ja a les 12 hores des de ferida (Borchert 1978) i aquesta activitat es continuava detectant als 3 i 6 dies (Lulai *et al* 2008, Kumar *et al* 2010). Recentment s'ha determinat la inducció del promotor d'*FHT* i l'acumulació d'*FHT* a través d'immunolocalització. S'ha observat que l'activació del promotor d'*FHT* té lloc a la zona ferida, que la proteïna es detecta ja des de les 24 hores a partir de la ferida i que els nivells de proteïna FHT augmenten progressivament fins al sisè dia (Boher *et al* 2013). L'anàlisi del proteoma de teixit ferit de tubercle de patata va mostrar la presència d'un gran grup de proteïnes de defensa, de detoxificació d'espècies d'oxigen reactives, de peroxidases i la *caffeoyl-CoA-3-O-metiltransferase*. Les dues últimes estan implicades en la biosíntesi de lignina i suberina, i tenen màxims d'acumulació entre els 4 i 8 dies després de la ferida (Chaves *et al* 2009). Pel què fa a altres processos que tenen lloc durant el desenvolupament del periderma cicatricial -com la divisió i expansió cel·lular- es va veure que els transcrits de gens implicats en la proliferació cel·lular, com les cinases dependents de ciclina, i gens de paret com les extensines i metil esterases de pectina, es detecten al cap d'un dia després de la ferida, i l'expressió es manté durant uns 14 dies (Neubauer *et al* 2012). En referència a la deposició de suberina durant la cicatrització de la ferida, s'ha observat que el domini aromàtic de la suberina és visible ja al primer dia mentre que el domini alifàtic és visible a partir del quart dia (Lulai i Corsini 1998, Lulai *et al* 2008). Aquests resultats estan en consonància amb el que s'observa al metaboloma al llarg del període de cicatrització en tubercle de patata (Yang i Bernards 2007). Tenint en compte aquestes dades, és interessant l'observació que el transcrit d'*FHT*, un gen implicat en la unió de compostos aromàtics amb alifàtics (Serra *et al* 2010b) aparegui abans que el transcrit de *CYP86A33*, un gen implicat en la

biosíntesi dels compostos alifàtics de la suberina (Serra *et al* 2009b). A més, i en la mateixa línia d'evidència, Naseer *et al* (2012) troben que el promotor d'*ASFT* -l'ortòleg d'*FHT* a *Arabidopsis* (Molina *et al* 2009)- s'activa abans a l'arrel que el promotor de *CYP86A1/HORST* -l'ortòleg de *CYP86A33* a *Arabidopsis* (Höfer *et al* 2008)-.

Els resultats obtinguts amb el transcrit d'*FHT* concorden amb el perfil d'acumulació de proteïna en fulla ferida, en la qual la proteïna es detecta dèbilment a les 24 hores de ser ferida i augmenta progressivament (Boher *et al* 2013). En fulla també s'ha analitzat la inducció per ferida d'altres gens implicats en la biosíntesi de compostos alifàtics i aromàtics de la suberina i de ceres. Es va veure que el missatger de la PAL s'indueix transitòriament i de forma molt ràpida per ferida, ja que tenia un màxim a les 2 hores de ser ferida i retornava als nivells originals al cap de 6 hores (Joos i Hahlbrock 1992). Pel que fa a gens implicats en la síntesi del domini alifàtic de la suberina, es va observar que el transcrit de *DAISY*, que codifica per una *ketoacil-CoA* sintasa que està implicada en l'elongació d'àcids grassos i derivats, té un màxim d'inducció al cap d'una hora de ser ferida (Franke *et al* 2009). En canvi, pel que fa als gens FAR que són coenzim A reductases d'àcids grassos i generen alcohols, tenen un màxim d'acumulació de transcrit després de 48 hores de ser ferida (Domergue *et al* 2010).

Discussió general

La regulació del periderma i els teixits suberitzats

Tot i la importància del periderma i la suberina per a la supervivència de les plantes terrestres, la regulació del polímer i el teixit és ara per ara força desconeguda. L'anàlisi global del transcriptoma de teixits suberitzats va permetre obtenir una llista de candidats de la regulació del periderma tant en surera com en patatera (Soler *et al* 2007, Soler *et al* 2011). S'ha aconseguit grans progressos pel que fa a la biosíntesi de suberina i ceres associades mitjançant els recursos genètics d'Arabidopsis i patatera (Ranathunge *et al* 2011, Serra *et al* 2010b, Serra *et al* 2009a, Serra *et al* 2009b), no obstant pel que fa a la caracterització funcional de factors de transcripció implicats en el periderma i la biosíntesi de suberina, hi ha encara un buit important. Fins ara s'ha observat que els missatgers de factors de transcripció de la família WRKY, NAM, AP2/ERF i MYB s'acumulen preferentment en teixits suberitzats (Soler *et al* 2008, Lasserre *et al* 2008, Almeida *et al* 2013). Molt recentment s'ha publicat que el gen *Myb41* d'Arabidopsis té la capacitat d'induir l'acumulació ectòpica de suberina quan es sobreexpressa amb el promotor 35S de CaMV (Kosma *et al* 2014). En aquest treball s'ha observat que paral·lelament a l'acumulació ectòpica de suberina hi ha inducció de gens de biosíntesi de suberina alifàtica i aromàtica. L'anàlisi per *Real time* del cDNA ha demostrat que s'activen diversos gens de biosíntesi de la suberina alifàtica: *FAR4*, *FAR5*, *GPAT5*, *CYP86A1*, *CYP86B1*, *ASFT*, la funció molecular dels quals s'ha demostrat mitjançant estratègies de genètica inversa (Domergue *et al* 2010, Beisson *et al* 2007, Li *et al* 2007a, Höfer *et al* 2008, Compagnon *et al* 2009, Gou *et al* 2009, Molina *et al* 2009). Paral·lelament a l'increment en la deposició dels monòmers alifàtics de la suberina, també s'observa un increment en fenilpropanoides típics del domini aromàtic de la suberina. L'augment en aquests metabòlits també va acompanyar d'una activació dels gens de la via dels fenilpropanoides, com ara, els gens que codifiquen per fenilalanina amoni-liasa, O-metiltransferasa i peroxidasa entre altres.

La formació del periderma, o més concretament del fel·lema, comprèn diversos passos on es combinen diferents processos com la proliferació cel·lular, diferenciació, senescència i mort cel·lular. La diferenciació del fel·lema va intrínsecament lligada a la deposició de suberina i ceres a la paret cel·lular i també a l'estrès abiòtic, els quals probablement són uns dels desencadenants de la mort cel·lular. Recolza la relació entre la formació del periderma i l'estrès el fet que, tant els estudis transcriptòmics com proteòmics de peridermes de patata i de surera han evidenciat una gran inducció de gens d'estrès abiòtic i fins i tot biòtic (Soler *et al* 2007, Barel i Ginzberg 2008, Soler *et al* 2011, Ricardo *et al* 2011). En la mateixa línia d'evidències s'ha observat que, l'ABA, l'hormona d'estrès abiòtic per excel·lència, té capacitat per induir la deposició de suberina i la inducció dels gens de biosíntesi corresponents tant en patata com Arabidopsis i tomata (Lulai *et al* 2008, Lee *et al* 2009, Leide *et al* 2012). A més a més, s'ha observat que a major acumulació de ceres, cutina i suberina, major tolerància es dona envers l'estrès hídric (Okazaki i Saito 2014).

Es fa evident doncs, que en la formació del periderma intervindran diverses xarxes de factors de transcripció que actuaran coordinadament i seqüencial per tal de produir el fel·lema madur. *StNAC103* s'indueix fortament al fel·lema de surera i patatera (Soler *et al* 2007, Soler 2008), té una funció predita de factor de transcripció i tenint en compte els processos cel·lulars i moleculars del fel·lema, pot tenir un paper clau en la regulació de la diferenciació del fel·lema, la deposició de suberina i ceres, l'estrès o la mort cel·lular. Aquest ventall ampli de possibles funcions fisiològiques és coherent amb la gran diversitat de fenòmens de regulació que abasta la família NAC de factors de transcripció.

Funció fisiològica d'*StNAC103*

StNAC103 és un gen que no mostra fenotip quan hi ha sobreexpressió ectòpica de forma constitutiva, però que mostra un fenotip molt evident quan es dóna silenciament específic i silenciament de la zona conservada. Aquest fenotip observat evidencia que *StNAC103* és un repressor de la biosíntesi de suberina i ceres perquè afecta directament o indirecta a l'expressió de gens que intervenen en etapes de la biosíntesi de suberina i ceres. Aquesta funció repressora de suberina i ceres d'*StNAC103* és compatible amb la presència d'activitat del promotor en les lenticel·les del tubercle. Les lenticel·les són àrees especials del periderma a on es dóna intercanvi de gasos. Concretament, la regulació d'aquest intercanvi es fa a través de proliferació cel·lular i suberització, les quals permeten i restringeixen l'intercanvi respectivament (Lendzian 2006). En aquest teixit doncs, *StNAC103* podria actuar per reprimir la suberificació quan calgués augmentar l'intercanvi gasós. És interessant remarcar que la funció repressora d'*StNAC103* es veu reforçada per l'activació del promotor observada en els primordis de les arrels secundàries (Garrote Gironès 2013). Tal i com evidencien Vermeer *et al* (2014) durant la formació de les arrels laterals, les cèl·lules de l'endoderma que recobreixen els primordis laterals, perden volum i canvien de forma, per això és lògic suposar que en aquest context, aquestes cèl·lules també renuncien a la funció de barrera per permetre que les arrels laterals puguin créixer. L'activació d'*StNAC103* en els primordis de les arrels laterals, el qual inhibeix l'acumulació de suberina i ceres, suggereix que la funció de barrera de l'endoderma que envolta les arrels laterals emergents és minvada.

L'anàlisi de l'activació del promotor en periderma natiu i cicatricial ha permès localitzar a nivell cel·lular, l'activació del promotor. Així doncs, s'observa que el promotor s'activa en les cèl·lules del fel·lema més

joves i en cèl·lules del parènquima sotmeses a una lesió mecànica a on ja ha començat la depleció d'amiloplastos i la deposició de suberina. Aquestes dades, juntament amb la co-expressió observada a nivell de transcrit entre *StNAC103* i *CYP86A33* en el teixit cicatricial, evidencien que l'acumulació de suberina i ceres no es dona de forma indefinida i que ha de ser regulada adequadament. A més, val la pena remarcar que no sempre un augment en la deposició de suberina implica una major barrera hidrofòbica, ja que la deposició ectòpica de suberina degut a la sobreexpressió de *CYP86A1* i *GPAT5* (Li *et al* 2007a) o de *Myb41* (Cominelli *et al* 2008, Kosma *et al* 2014) per exemple, fins i tot dona lloc a una pèrdua de la barrera hidrofòbica de la cutícula. Per tant, *StNAC103*, que és un regulador negatiu, podria optimitzar la despesa energètica del teixit a l'hora de generar la barrera hidrofòbica del periderma. Recolza aquest supòsit que les línies silenciades per *StNAC103* que presenten un increment en suberina i ceres no presenten ni disminució ni augment en la permeància hídrica del periderma (Quintana Vehí 2013).

La presència de caixes regulables per estrès biòtic i abiòtic, la capacitat del gen per respondre a hormones d'estrès com ABA, àcid salícilic i etilè i la capacitat d'ABA per induir l'acumulació del transcrit d'*StNAC103* (Garrote Gironès 2013) suggereixen que el gen respon a estrès i forma part de la resposta a l'estrès. Si bé però, el paper concret del gen *StNAC103* durant l'estrès és ara per ara desconegut.

Regulació i activitat molecular d'*StNAC103*

Malgrat que, tal i com s'ha comentat anteriorment la funció fisiològica d'*StNAC103* consisteix en reprimir l'acumulació de suberina i ceres, no disposem d'evidències encara que demostrin que *StNAC103* interacciona directament amb els promotors de gens de biosíntesi de suberina i ceres, ni que la proteïna *StNAC103* sigui la responsable directa de la repressió d'aquests gens. No podem descartar que *StNAC103* actuï sobre algun gen o procés que, posteriorment, reguli gens de biosíntesi de suberina i ceres. Tenint present que es va demostrar que l'ABA té la capacitat d'induir acumulació de transcrit d'*StNAC103* (Garrote Gironès 2013), i que l'anàlisi del promotor prediu també la regulació per etilè, *StNAC103* podria afectar a algun o alguns factors de transcripció de la via de transducció d'ABA o d'etilè i que aquests actuessin directament sobre els gens de biosíntesi de suberina i ceres.

Per altra banda, el fet que s'hagi observat que alguns membres de la família NAC oligomeritzen i també que no s'hagi observat efectes fenotípics quan es sobreexpressa de forma constitutiva StNAC103, suggereix que el factor de transcripció necessita d'altres *partners* per poder actuar. Les anàlisis *in silico* han predit una interacció amb proteïnes relacionades amb la regulació del cicle cel·lular. Aquestes prediccions són coherents amb els resultats d'activació del promotor en la zona de divisió de les arrels secundàries, en el fel·logen lenticel·lar i en el parènquima ferit, ja que en aquests casos es dona divisió cel·lular. En canvi, l'activació del promotor en el fel·lema no sembla d'entrada, que es pugui relacionar amb la regulació cel·lular en el mateix sentit que es donaria en les arrels secundàries, el fel·logen lenticel·lar i el periderma cicatricial. No obstant, podria donar-se el cas que en diferents teixits, StNAC103 s'unís a diferents *partners* i que el resultat final d'aquestes interaccions diferents donés lloc en alguns casos a complexos transcripcionals activadors i en altres, a complexos inhibidors.

En un treball paral·lel es va demostrar que StNAC103 té capacitat de translocar-se al nucli (Garrote Gironès 2013), confirmant per tant, la presència d'NLSs predita per les anàlisis *in silico* i el treball de Singh *et al* (2013). És interessant també però, la presència de senyals d'exportació nuclear, la qual cosa suggereix que l'activitat del factor de transcripció es pugui regular a través d'importació/exportació nuclear. En aquest sentit és possible que modificacions post-traduccionals, com per exemple la fosforilació i/o la sumoilació, regulin aquest transport nucleo-citoplasmàtic i en conseqüència, l'activació o inhibició de determinats gens. De tota manera, val la pena remarcar que tant la fosforilació com la sumoilació són modificacions que poden estar regulant processos cel·lulars molt diferents, per la qual cosa caldrà encara demostrar que es donen aquests tipus de modificacions i en aquest cas, també determinar quins processos cel·lulars regularien aquestes modificacions.

Perspectives futures

Aquesta tesi ha permès entendre millor la funció fisiològica d'StNAC103 i el seu paper en els teixits suberitzats. La caracterització de les línies silenciades a través de la composició química de la suberina i ceres i l'obtenció de plantes transgèniques que contenen gens deladors sota control del promotor d'StNAC103 han permès determinar els efectes químics del silenciament en el periderma i localitzar la inducció del promotor a nivell cel·lular. Així doncs, ara sabem que el silenciament del gen indueix un

augment de suberina i ceres i que el promotor s'activa en teixits sotmesos a suberificació i/o a proliferació cel·lular. No obstant, la manca de resultats en la sobreexpressió es podria explicar també pels resultats negatius obtinguts amb unes línies transformades de forma estable i dissenyades per obtenir proteïna StNAC103 fusionada a etiquetes com l'antigen de l'hemaglutinina o la GFP, que s'han obtingut paral·lelament a aquesta tesi (Mercè Figueras, comunicació personal). En aquestes línies s'ha utilitzat també el promotor 35S del CaMV i no s'ha detectat acumulació de la proteïna de fusió en fulla pel cas de l'antigen de l'hemaglutinina i s'ha detectat acumulació molt dèbil en fulla per dues de les deu línies fusionades a GFP, malgrat que s'ha confirmat la inserció del transgen. La manca d'acumulació d'aquestes proteïnes de fusió, juntament amb la manca de fenotip remarcable en les línies de sobreexpressió, tot i haver comprovat l'acumulació del transcrit en un dels casos, fa sospitar que es pugui donar algun tipus de regulació post-traduccional de la proteïna StNAC103 o que la sobreexpressió ectòpica del promotor 35S tingui algun inconvenient a llarg termini. Per tal de resoldre aquest dubte, es podrien obtenir plantes transgèniques que tinguessin gens delatadors fusionats al cDNA d'*StNAC103*, i que aquests gens es trobessin controlats pel promotor d'*StNAC103*.

Per altra banda, i tenint present que els factors de transcripció actuen acompanyats en grans complexos transcripcionals, aquest fet podria ser un motiu pel qual no s'obté fenotip amb les línies de sobreexpressió i donaria suport a aquesta idea, el fet que s'ha predit també diferents dianes de modificació post-traduccional que impliquen interacció amb proteïnes. En aquest sentit, és interessant realitzar la tècnica dels dos-híbrids per tal de determinar quines proteïnes interaccionen amb StNAC103 i així entendre millor com actua la proteïna i com es regula la seva activitat.

És també interessant recordar que, tot i que les dades de transcriptòmica de les línies silenciades mostren que la transcripció d'alguns gens de biosíntesi de suberina i ceres està induïda, encara no disposem d'evidències que demostrin efectes directes d'*StNAC103* en la repressió d'aquests gens en plantes salvatges. És per aquest motiu que en el nostre laboratori es van començar a produir dues línies transgèniques diferents: *StNAC103* fusionada a GFP i *StNAC103* fusionada a l'antigen de l'hemaglutinina. Aquestes línies havien de servir per a realitzar la immunoprecipitació de la cromatina i identificar promotors de gens en els immunoprecipitats. No obstant, de moment no s'ha obtingut bons nivells d'acumulació de proteïna de fusió en les plantes estables, malgrat que la mateixa construcció s'ha utilitzat amb èxit per a la transformació transitòria i ha permès detectar de forma clara la proteïna de fusió (Garrote Gironès 2013). Esperem que les plantes transgèniques que continguin la fusió *StNAC103*-GFP sota control del promotor d'*StNAC103* ens permetin entendre millor la regulació de la proteïna per poder optimitzar l'acumulació de la proteïna de fusió i així realitzar la immunoprecipitació de la cromatina. Fins i tot, en cas de disposar de la manera d'acumular bons nivells de proteïna de fusió en plantes transgèniques transformades establement, es podria realitzar assajos de co-immunoprecipitació, els quals permetrien confirmar per una altra tècnica experimental els resultats que es podrien obtenir amb la tècnica del doble híbrid.

Un cop identificades les dianes del factor de transcripció StNAC103, es podria demostrar el seu efecte repressor o activador transformant transitòriament cèl·lules vegetals amb vectors que continguin la zona codificant d'*StNAC103* sota control d'un promotor fort i vectors que continguin el promotor diana que controla un gen delator. En cas que l'activació d'*StNAC103* anés acompanyada d'un augment en l'acumulació de l'activitat delatora voldria dir que activa el gen en qüestió i en cas que disminuís l'activitat voldria dir que el reprimeix.

A nivell global doncs, podem dir que ara sabem que StNAC103 és un repressor de l'acumulació de suberina i ceres, però falta entendre encara el mecanisme molecular que dóna lloc a aquesta repressió, ja sigui a través de les dianes del factor de transcripció, o bé de la regulació de l'activitat i estabilitat de la proteïna i les proteïnes acompanyants. A més, a més, cal tenir present que els processos de desenvolupament depenen de factors varis que moltes vegades estan interrelacionats, per tant, és molt possible que StNAC103 es trobi en la cruïlla de diferents vies de transducció del senyal, per la qual cosa sens dubte aquestes qüestions també són interessants de resoldre en un futur.

Conclusions generals

- 1) En la sobreexpressió d'*StNAC103* no s'observen efectes ni en la càrrega total de suberina i ceres, ni en l'acumulació de les diferents classes de substàncies, ni en la composició d'aquestes.
- 2) En la sobreexpressió d'*StNAC103* no s'observen efectes en la permeància hídrica del periderma.
- 3) El silenciament de la zona conservada i específica d'*StNAC103* dóna lloc a una major acumulació de la càrrega total de suberina i ceres.
- 4) Les línies NSC i NSE presenten una major acumulació d'alcanes en les ceres i aquesta afectació es dóna en tots els alcanes en NSC i en els alcanes de C₂₃, C₂₅ i C₂₇ a NSE.
- 5) Les línies NSC presenten un increment en els èsters parells majors de C₂₂ i una disminució significativa en els èsters de C₁₈ i C₂₀ de les ceres.
- 6) Les línies NSC i NSE presenten una major acumulació d'alcohols, ω -hidroxiàcids i àcid ferúlic en la suberina.
- 7) Tant en les línies NSC com NSE, en la suberina s'observa un increment significatiu en els alcohols parells majors de C₂₄.
- 8) Tant en les línies NSC com NSE s'observa un increment significatiu en ω -hidroxiàcids de C_{18:1}, C₂₀, C₂₆ i C₂₈ i en diàcids de C_{18:1} i C₂₈.
- 9) En el silenciament d'*StNAC103* no s'observa cap efecte en l'organització tissular del fel·lema ni en l'organització lamel·lar de la suberina.
- 10) La PCR a temps real confirma l'acumulació de transcrit d'*StNAC103* en teixits suberitzats com l'arrel i el fel·lema.
- 11) L'activació del promotor d'*StNAC103* es dóna en les capes basals del fel·lema, en cèl·lules amb paret suberificada i cèl·lules que estan sotmeses a suberificació.
- 12) El promotor d'*StNAC103* s'activa dèbilment a l'endoderma i l'exoderma.
- 13) El procés de cicatrització de la ferida en tubercle indueix acumulació del transcrit d'*StNAC103* a les 24 hores de ser ferit i els nivells augmenten progressivament fins a les 144 hores.

- 14) El tubercle ferit indueix acumulació del missatger de *CYP86A33* a les 24 hores i aquests nivells van augmentant fins arribar a un màxim a les 72 hores.
- 15) *FHT* s'indueix per ferida en tubercle ja a les 4 hores després de la lesió i aquests nivells arriben a un màxim a les 48 o 72 hores.
- 16) En fulla ferida de la varietat *Désirée* s'observa que el transcrit d'*StNAC103* i *CYP86A33* s'acumula a les 24 hores o 48 hores, mentre que el d'*FHT* ho fa a les 6 hores després de la ferida.
- 17) En la subespècie *andigena* també s'observa inducció d'*StNAC103* en fulla ferida, a les 24 hores després de la lesió, així com també en la fulla sistèmica d'una planta ferida.
- 18) L'activació del promotor es dóna en la capa de tancament del tubercle ferit. Concretament s'observa que, en el citoplasma, hi ha evidències de depleció d'amilooplastos.

Bibliografia

- Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, *et al.* 2009. Fruit-Surface Flavonoid Accumulation in Tomato Is Controlled by a *SlMYB12*-Regulated Transcriptional Network. *PLoS Genet* 5: e1000777
- Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M. 2008. Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *Journal of Experimental Botany* 59: 2717-33
- Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, 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: 2463-80
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. 1997. Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant. *Plant Cell* 9: 841-57
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M. 2002. Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the Arabidopsis embryo. *Development* 129: 3965-74
- Almeida T, Menéndez E, Capote T, Ribeiro T, Santos C, Gonçalves S. 2013. Molecular characterization of *Quercus suber* MYB1, a transcription factor up-regulated in cork tissues. *Journal of Plant Physiology* 170: 172
- Artschwager E. 1927. Wound periderm formation in the potato as affected by temperature and humidity. *Journal of Agricultural Research* 35: 995-1000
- Bailey T, C. E. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 2: 28-36
- Balazadeh S, Kwasniewski M, Caldana C, Mehrnia M, Zanor MI, *et al.* 2011. ORS1, an H₂O₂-Responsive NAC Transcription Factor, Controls Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 4: 346-60
- Banerjee AK, Prat S, Hannapel DJ. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science* 170: 732
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S. 2002. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305
- Barel G, Ginzberg I. 2008. Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *J. Exp. Bot.* 59: 3347-57
- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M. 2012. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 329
- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB. 2007. The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of Arabidopsis. *Plant Cell*: tpc.106.048033
- Bernard A, Domergue F, Pascal S, Jetter R, Renne C, *et al.* 2012. Reconstitution of Plant Alkane Biosynthesis in Yeast Demonstrates That Arabidopsis ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 Are Core Components of a Very-Long-Chain Alkane Synthesis Complex. *The Plant Cell Online* 24: 3106-18
- Bernards MA. 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80: 227-40
- Bernards MA, Razem FA. 2001. The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall biopolymer. *Phytochemistry* 57: 1115-22
- Bhasin M, Raghava GPS. 2004. ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic Acids Research* 32: W414-W19
- Blein T, Pulido A, Vialette-Guiraud A, Nikovics K, Morin H, *et al.* 2008. A Conserved Molecular Framework for Compound Leaf Development. *Science* 322: 1835-39
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *PROTEOMICS* 4: 1633
- 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: 3225-36
- Böhmer M, Schroeder JI. 2011. Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in Arabidopsis suspension cells. *The Plant Journal* 67: 105
- Borchert R. 1978. Time Course and Spatial Distribution of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Peroxidase Activity in Wounded Potato Tuber Tissue. *Plant Physiology* 62: 789-93

- Borner GHH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P. 2003. Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Physiology* 132: 568-77
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, *et al.* 2011. High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *The Plant Cell Online* 23: 873-94
- Bu Q, Jiang H, Li C-B, Zhai Q, Zhang J, *et al.* 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res* 18: 756
- Carrera E, Prat S. 1998. Expression of the Arabidopsis *abi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *The Plant Journal* 15: 765-71
- Carroll H, Beckstead W, O'Connor T, Ebbert M, Clement M, *et al.* 2007. DNA reference alignment benchmarks based on tertiary structure of encoded proteins. *Bioinformatics* 23: 2648-49
- Cenci A, Guignon V, Roux N, Rouard M. 2014. Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots. *Plant Molecular Biology*: 1-18
- Charoensawan V, Wilson D, Teichmann SA. 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Research* 38: 7364-77
- Chaves I, Pinheiro C, Paiva JAP, Planchon S, Sergeant K, *et al.* 2009. Proteomic evaluation of wound-healing processes in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *PROTEOMICS* 9: 4154-75
- Chen M, Mooney BP, Hajduch M, Joshi T, Zhou M, *et al.* 2009. System Analysis of an Arabidopsis Mutant Altered in de Novo Fatty Acid Synthesis Reveals Diverse Changes in Seed Composition and Metabolism. *Plant Physiology* 150: 27-41
- Christiansen M, Holm P, Gregersen P. 2011. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes* 4: 302
- Christianson JA, Dennis ES, Llewellyn DJ, Wilson IW. 2009a. ATAF NAC transcription factors: Regulators of plant stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* 5: 428
- Christianson JA, Wilson IW, Llewellyn DJ, Dennis ES. 2009b. The Low-Oxygen-Induced NAC Domain Transcription Factor ANAC102 Affects Viability of Arabidopsis Seeds following Low-Oxygen Treatment. *Plant Physiology* 149: 1724-38
- Coego A, Brizuela E, Castillejo P, Ruíz S, Koncz C, *et al.* 2014. The TRANSPLANTA Collection of Arabidopsis Lines: A resource for Functional Analysis of Transcription Factors based on their conditional overexpression. *The Plant Journal*: n/a
- Cohen SX, Moulin M, Hashemolhosseini S, Kilian K, Wegner M, Muller CW. 2003. Structure of the GCM domain-DNA complex: a DNA-binding domain with a novel fold and mode of target site recognition. *EMBO J* 22: 1835
- Collinge M, Boller T. 2001. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* 46: 521
- 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: 53-64
- Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, *et al.* 2009. CYP86B1 Is Required for Very Long Chain ω -Hydroxyacid and α,ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed Suberin Polyester. *Plant Physiology* 150: 1831-43
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90
- Cottle W, Kolattukudy PE. 1982. Biosynthesis, Deposition, and Partial Characterization of Potato Suberin Phenolics. *Plant Physiol.* 69: 393-99
- Daimon Y, Takabe K, Tasaka M. 2003. The *CUP-SHAPED COTYLEDON* Genes Promote Adventitious Shoot Formation on Calli. *Plant and Cell Physiology* 44: 113-21

- de Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, *et al.* 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* 34: W362-W65
- de Mendoza A, Sebé-Pedrós A, Šestak MS, Matečić M, Torruella G, *et al.* 2013. Transcription factor evolution in eukaryotes and the assembly of the regulatory toolkit in multicellular lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Dean BB. 1989. Deposition of Aliphatic Suberin Monomers and Associated Alkanes during Aging of *Solanum tuberosum* L. Tuber Tissue at Different Temperatures. *Plant Physiol* 89: 1021-23
- Dean BB, Kolattukudy PE, Davis RW. 1977. Chemical Composition and Ultrastructure of Suberin from Hollow Heart Tissue of Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Physiology* 59: 1008-10
- Delorenzi M, Speed T. 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18: 617-25
- Dobránszki J. 2001. EFFECTS OF LIGHT ON IN VITRO TUBERIZATION OF THE POTATO CULTIVAR DÉsirÉE AND ITS RELATIVES. *Acta Biologica Hungarica* 52: 137-47
- Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee JA, *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: 1539-54
- Donze T, Qu F, Twigg P, Morris TJ. 2013. Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in Arabidopsis by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology* 449: 207
- Duval M, Hsieh T-F, Kim S, Thomas T. 2002. Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50: 237-48
- Eigenbrode SD, Espelie KE. 1995. EFFECTS OF PLANT EPICUTICULAR LIPIDS ON INSECT HERBIVORES. *Annual Review of Entomology* 40: 171-94
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protocols* 2: 953-71
- Ernst HA, Nina Olsen A, Skriver K, Larsen S, Lo Leggio L. 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* 5: 297
- Espelie KE, Franceschi VR, Kolattukudy PE. 1986. Immunocytochemical Localization and Time Course of Appearance of an Anionic Peroxidase Associated with Suberization in Wound-Healing Potato Tuber Tissue. *Plant Physiology* 81: 487-92
- Evert RF, Eichhorn SE. 2006. *Essau's Plant Anatomy*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 624 pp.
- Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L. 2008. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 280: 547
- Fasman GD. 1989. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Springer.
- Fernie AR, Willmitzer L. 2001. Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. *Plant Physiology* 127: 1459-65
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, *et al.* 2005. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues--a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66: 2643
- Franke R, Höfer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, *et al.* 2009. The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *The Plant Journal* 57: 80-95
- Franke R, Schreiber L. 2007. Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 10: 252-9
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, *et al.* 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* 39: 863
- Garrote Gironès A. 2013. *StNAM002 regula la biosíntesi de la suberina, presenta inducció per ABA i ferida i està implicat en la desenvolupament de l'arrel*. Universitat de Girona, Girona. 67 pp.

- 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* 106: 18855-60
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, et al. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 38: W695-W99
- Graça J, Pereira H. 2000. Suberin Structure in Potato Periderm: Glycerol, Long-Chain Monomers, and Glyceryl and Feruloyl Dimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5476-83
- Graça J, Santos S. 2007. Suberin: A Biopolyester of Plants' Skin. *Macromolecular Bioscience* 7: 128-35
- Guan Q, Yue X, Zeng H, Zhu J. 2014. The Protein Phosphatase RCF2 and Its Interacting Partner NAC019 Are Critical for Heat Stress-Responsive Gene Regulation and Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*
- Hammes UZ, Schachtman DP, Berg RH, Nielsen E, Koch W, et al. 2005. Nematode-Induced Changes of Transporter Gene Expression in Arabidopsis Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1247
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, et al. 2003. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant molecular biology* 53: 383-97
- Hibara K-i, Takada S, Tasaka M. 2003. *CUC1* gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *The Plant Journal* 36: 687
- Hickman R, Hill C, Penfold CA, Breeze E, Bowden L, et al. 2013. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*: n/a
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297-300
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R. 2008. The Arabidopsis cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 59: 2347-60
- Höll J, Vannozzi A, Czemplin S, D'Onofrio C, Walker AR, et al. 2013. The R2R3-MYB Transcription Factors MYB14 and MYB15 Regulate Stilbene Biosynthesis in *Vitis vinifera*. *The Plant Cell Online*
- Holloway PJ. 1983. Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22: 495
- Hooker TS, 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 Online* 19: 904-13
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, et al. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* 35: W585-W87
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, et al. 2008. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008: 5
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, et al. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12987-92
- Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G. 2010. Comprehensive Analysis of NAC Domain Transcription Factor Gene Family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 10: 145
- Huang W, Miao M, Kud J, Niu X, Ouyang B, et al. 2013. SINAC1, a stress-related transcription factor, is fine-tuned on both the transcriptional and the post-translational level. *New Phytologist* 197: 1214-24
- Hussey G, Stacey NJ. 1981. In Vitro Propagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* 48: 787-96
- Hussey S, Mizrahi E, Spokevicius A, Bossinger G, Berger D, Myburg A. 2011. *SND2*, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus. *BMC Plant Biology* 11: 173
- Hussey SG, Mizrahi E, Creux NM, Myburg AA. 2013. Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Frontiers in Plant Science* 4

- Ishida T, Aida M, Takada S, Tasaka M. 2000. Involvement of *CUP-SHAPED COTYLEDON* Genes in Gynoecium and Ovule Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41: 60-67
- Iqbal M. 1995. The Cambial Derivatives - Enciclopedia of Plant Anatomy.
- Järvinen R, Silvestre AJD, Holopainen U, Kaimainen M, Nyyssölä A, *et al.* 2009. Suberin of Potato (*Solanum tuberosum* Var. Nikola): Comparison of the Effect of Cutinase CcCut1 with Chemical Depolymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9016
- Jaspers P, Blomster T, Brosché M, Salojärvi J, Ahlfors R, *et al.* 2009. Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors. *The Plant Journal* 60: 268
- Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, *et al.* 2009. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signaling. *Biochemical Journal*
- Jeong JS, Park YT, Jung H, Park S-h, Kim J-k. 2009. Rice NAC proteins act as homodimers and heterodimers. *Plant Biotechnology Reports* 3: 127
- Jeong R-D, Chandra-Shekara AC, Kachroo A, Klessig DF, Kachroo P. 2008. HRT-Mediated Hypersensitive Response and Resistance to Turnip crinkle virus in *Arabidopsis* Does Not Require the Function of TIP, the Presumed Guard Cell Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1316
- Jin J, Zhang H, Kong L, Gao G, Luo J. 2013. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research* 42: D1182-D87
- John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D. 1997. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* 33: 641-51
- Joos H-J, Hahlbrock K. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). *European Journal of Biochemistry* 204: 621-29
- Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28: 27-30
- Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, *et al.* 2007. The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 1278-94
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, *et al.* 2003. P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with *Arabidopsis* Development and miRNA Function. *Developmental Cell* 4: 205-17
- Kelley LA, Sternberg MJE. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols* 4: 363
- Kersters G. 2006. Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany* 57: 2493-99
- Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano HY. 2000. Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Molecular and General Genetics MGG* 262: 1047
- Kim JH, Kim HS, Lee YH, Kim YS, Oh HW, *et al.* 2008. Polyamine Biosynthesis Regulated by StARD Expression Plays an Important Role in Potato Wound Periderm Formation. *Plant Cell Physiol.* 49: 1627-32
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, *et al.* 2009. Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* 323: 1053-57
- Kim S, Park M, Yeom S-I, Kim Y-M, Lee JM, *et al.* 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet* 46: 270
- Kleinow T, Himbert S, Krenz B, Jeske H, Koncz C. 2009. NAC domain transcription factor ATAF1 interacts with SNF1-related kinases and silencing of its subfamily causes severe developmental defects in *Arabidopsis*. *Plant Science* 177: 360 - 70
- Ko J-H, Yang SH, Park AH, Lerouxel O, Han K-H. 2007. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 50: 1035

- Koch M, Vorwerk S, Masur C, Sharifi-Sirchi G, Olivieri N, Schlaich NL. 2006. A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *The Plant Journal* 47: 629
- Kolattukudy P, Agrawal V. 1974. Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids* 9: 682
- Kolattukudy PE. 1980. Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin. *Science* 208: 990-1000
- Kolattukudy PE, Dean BB. 1974. Structure, Gas Chromatographic Measurement, and Function of Suberin Synthesized by Potato Tuber Tissue Slices. *Plant Physiol.* 54: 116-21
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, et al. 2009. The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology* 151: 1918-29
- Kosma DK, Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M. 2012. Identification of an Arabidopsis Fatty Alcohol:Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase Required for the Synthesis of Alkyl Hydroxycinnamates in Root Waxes1. *Plant Physiology*
- Kosma DK, Murmu J, Razeq FM, Santos P, Bourgault R, et al. 2014. AtMYB41 Activates Ectopic Suberin Synthesis and Assembly in Multiple Plant Species and Cell Types. *The Plant Journal*: n/a-n/a
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, et al. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development* 19: 1855-60
- Kumar G, Lulai E, Suttle J, Knowles N. 2010. Age-induced loss of wound-healing ability in potato tubers is partly regulated by ABA. *Planta* 232: 1433
- Kunst L, Samuels AL. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42: 51
- Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R. 2013. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis Research*: 1-14
- la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection* 17: 527-36
- Lakhotia N, Joshi G, Bhardwaj A, Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, et al. 2014. Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biology* 14: 6
- Lam P, Zhao L, McFarlane HE, Aiga M, Lam V, et al. 2012. RDR1 and SGS3, Components of RNA-Mediated Gene Silencing, Are Required for the Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Developing Inflorescence Stems of Arabidopsis. *Plant Physiology* 159: 1385-95
- Lambert C, Léonard N, De Bolle X, Depiereux E. 2002. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18: 1250-56
- 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: 1051-61
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J. 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131: 4311-22
- Le Hénanff G, Profizi C, Courteaux B, Rabenoelina F, Gérard C, et al. 2013. Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. *Journal of Experimental Botany*
- Lee SB, Go YS, Bae H-J, Park JH, Cho SH, 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: 42-54
- Lee SB, Suh MC. 2013. Recent Advances in Cuticular Wax Biosynthesis and Its Regulation in Arabidopsis. *Molecular Plant* 6: 246-49
- Leide J, Hildebrandt U, Hartung W, Riederer M, Vogg G. 2012. Abscisic acid mediates the formation of a suberized stem scar tissue in tomato fruits. *New Phytologist* 194: 402-15

- Lendzian KJ. 2006. Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *J. Exp. Bot.* 57: 2535-46
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, *et al.* 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30: 325-27
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J. 2013. Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book* 11
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, *et al.* 2010. Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 8: e0133
- Li J, CHEN X, LUO L-Q, YU J, MING F. 2013. Functions of ANAC092 involved in regulation of anther development in *Arabidopsis thaliana*. *HEREDITAS* 35: 913-22
- Li Y, Beisson F, Koo AJK, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J. 2007a. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 18339-44
- Li Y, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M. 2007b. Monoacylglycerols Are Components of Root Waxes and Can Be Produced in the Aerial Cuticle by Ectopic Expression of a Suberin-Associated Acyltransferase. *Plant Physiology* 144: 1267-77
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163: 16
- Lopez-Molina L, Chua N-H. 2000. A Null Mutation in a bZIP Factor Confers ABA-Insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 41: 541-47
- Lü S, Zhao H, Des Marais DL, Parsons EP, Wen X, *et al.* 2012. Arabidopsis ECERIFERUM9 Involvement in Cuticle Formation and Maintenance of Plant Water Status. *Plant Physiology* 159: 930-44
- Lulai E. 2007. The Canon of Potato Science: 43. Skin-set and Wound-healing/Suberization. *Potato Research* 50: 387
- Lulai EC, Corsini DL. 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum*L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 209-22
- Lulai EC, Freeman TP. 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: 555-61
- Lulai EC, Suttle JC, Pederson SM. 2008. Regulatory involvement of abscisic acid in potato tuber wound-healing. *Journal of Experimental Botany* 59: 1175-86
- Luo J, Butelli E, Hill L, Parr A, Niggeweg R, *et al.* 2008. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *The Plant Journal* 56: 316-26
- Lupas AA, Van Dyke MM, Stock JJ. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science (New York, N.Y.)* 252: 1162
- Ma N-N, Zuo Y-Q, Liang X-Q, Yin B, Wang G-D, Meng Q-W. 2013. The multiple stress-responsive transcription factor SINAC1 improves the chilling tolerance of tomato. *Physiologia Plantarum*: n/a
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B. 2004. MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs. *Current Biology* 14: 1035
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1983. Molecular cloning. A laboratory manual by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. . *Biochemical Education*: 545
- Martienssen RA. 1998. Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 2021-26

- Massa AN, Childs KL, Lin H, Bryan GJ, Giuliano G, Buell CR. 2011. The Transcriptome of the Reference Potato Genome *Solanum tuberosum* Group Phureja Clone DM1-3 516R44. *PLoS ONE* 6: e26801
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. 2005. The Arabidopsis Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Physiology* 138: 1083-96
- Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB. 2013. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, *et al.* 2007. NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 270-80
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M. 2008. NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity. *The Plant Journal* 56: 768-78
- Moire L, Schmutz A, Buchala A, Yan B, Stark RE, Ryser U. 1999. Glycerol Is a Suberin Monomer. New Experimental Evidence for an Old Hypothesis. *Plant Physiology* 119: 1137-46
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M. 2009. Identification of an Arabidopsis Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiology* 151: 1317-28
- Mousavi A, Hotta Y. 2005. Glycine-rich proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 120: 169-74
- Müller D, Schmitz G, Theres K. 2006. Blind Homologous R2R3 Myb Genes Control the Pattern of Lateral Meristem Initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 18: 586-97
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N. 2012. Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 10101-06
- Nawrath C. 2002. The Biopolymers Cutin and Suberin. *The Arabidopsis Book*: e0021
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. 2013. Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*: e0167
- Neubauer JD, Lulai EC, Thompson AL, Suttle JC, Bolton MD. 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: 586-95
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols* 1: 1559
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, *et al.* 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465: 30
- Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S. 2013. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4
- Oh S-K, Lee S, Yu S, Choi D. 2005. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta* 222: 876-87
- Okazaki Y, Saito K. 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *The Plant Journal* 79: 584-96
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. 2005a. DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science* 169: 785
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. 2005b. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10: 79
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Johansson E, Larsen S, Skriver K. 2004. Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallographica Section D* 60: 112-15
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, *et al.* 2003. Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 10: 239-47

- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, *et al.* 2007. The Arabidopsis *DESPERADO/AtWBC11* Transporter Is Required for Cutin and Wax Secretion. *Plant Physiology* 145: 1345-60
- Panikashvili D, Shi JX, Bocobza S, Franke RB, Schreiber L, Aharoni A. 2010. The Arabidopsis *DSO/ABCG11* Transporter Affects Cutin Metabolism in Reproductive Organs and Suberin in Roots. *Molecular Plant* 3: 563-75
- Pascal S, Bernard A, Sorel M, Pervent M, Vile D, *et al.* 2013. The Arabidopsis *cer26* mutant, like the *cer2* mutant, is specifically affected in the very long chain fatty acid elongation process. *The Plant Journal* 73: 733-46
- Paz MM, Veilleux RE. 1999. Influence of culture medium and *in vitro* conditions on shoot regeneration in *Solanum phureja* monoploids and fertility of regenerated doubled monoploids. *Plant Breeding* 118: 53-57
- Pei H, Ma N, Tian J, Luo J, Chen J, *et al.* 2013. A NAC Transcription Factor Controls Ethylene-Regulated Cell Expansion in Flower Petals. *Plant Physiology*
- Pérez-Rodríguez P, Riaño-Pachón DM, Corrêa LGG, Rensing SA, Kersten B, Mueller-Roeber B. 2009. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research* 38: D822-D27
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-07
- Pinheiro GL, Marques CS, Costa MDBL, Reis PAB, Alves MS, *et al.* 2009. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444: 10
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236-46
- Puranik S, Sahu PP, Mandal SN, B VS, Parida SK, Prasad M. 2013. Comprehensive Genome-Wide Survey, Genomic Constitution and Expression Profiling of the NAC Transcription Factor Family in Foxtail Millet (*Setaria italica* L.). *PLoS ONE* 8: e64594
- Quach TN, Tran L-SP, Valliyodan B, Nguyen HTM, Kumar R, *et al.* 2014. Functional Analysis of Water Stress-Responsive Soybean GmNAC003 and GmNAC004 Transcription Factors in Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 9: e84886
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, *et al.* 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research* 33: W116-20
- Quintana Vehí J-A. 2013. *Characterization of FHT and StNAC02*. Universitat de Girona, Girona. 31 pp.
- Raffaele S, Vaillau F, Léger A, Joubès J, Miersch O, *et al.* 2008. A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20: 752-67
- Raman S, Greb T, Peaucelle A, Blein T, Laufs P, Theres K. 2008. Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55: 65
- Ranathunge K, Schreiber L, Franke R. 2011. Suberin research in the genomics era--New interest for an old polymer. *Plant Science* 180: 399
- Rauf M, Arif M, Fisahn J, Xue G-P, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. 2013. NAC Transcription Factor SPEEDY HYPONASTIC GROWTH Regulates Flooding-Induced Leaf Movement in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*
- Ren T, Qu F, Morris TJ. 2000. *HRT* Gene Function Requires Interaction between a NAC Protein and Viral Capsid Protein to Confer Resistance to Turnip Crinkle Virus. *The Plant Cell Online* 12: 1917-25
- Ricardo CPP, Martins I, Francisco R, Sergeant K, Pinheiro C, *et al.* 2011. Proteins associated with cork formation in *Quercus suber* L. stem tissues. *Journal of Proteomics* 74: 1266-78
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Z C, *et al.* 2000. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290: 2105-10

- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protocols* 5: 725
- Rozen S, Skaletsky H. 1999. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols*, ed. S Misener, S Krawetz, pp. 365-86: Humana Press
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ. 1999. Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405-19
- Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, et al. 2008. Tobacco Transcription Factors: Novel Insights into Transcriptional Regulation in the *Solanaceae*. *Plant Physiology* 147: 280-95
- Sabba RP, Lulai EC. 2002. Histological Analysis of the Maturation of Native and Wound Periderm in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber. *Annals of Botany* 90: 1-10
- Sablowski RWM, Meyerowitz EM. 1998. A Homolog of *NO APICAL MERISTEM* Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92: 93
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008. Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells. *Annual Review of Plant Biology* 59: 683-707
- Schönherr J, Lenzian K. 1981. A Simple and Inexpensive Method of Measuring Water Permeability of Isolated Plant Cuticular Membranes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 102: 321
- Schreiber L, Franke R, 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
- Schreiber L, Riederer M. 1996. Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* 107: 426-32
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaian MA. 2005. A NAC Domain Protein Interacts with Tomato leaf curl virus Replication Accessory Protein and Enhances Viral Replication. *The Plant Cell Online* 17: 311-25
- Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park M-J, Go YS, Park C-M. 2011. The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23: 1138-52
- Serra O. 2008. *Functional Genetics of Suberin: The Role of CYP86A33 and StKCS6 in potato tuber periderm*. Doctoral thesis thesis. Universitat de Girona, Girona. 101 pp.
- Serra O, Chatterjee S, Figueras M, Molinas M, Stark RE. 2014. Deconstructing a plant macromolecular assembly: chemical architecture, molecular flexibility, and mechanical performance of natural and engineered potato suberins. *Biomacromolecules*
- Serra O, Figueras M, Franke R, Prat S, Molinas M. 2010a. Unraveling ferulate role in suberin and periderm biology by reverse genetics. *Plant Signaling & Behavior* 5: 953
- Serra O, Hohn C, Franke R, Prat S, Molinas M, Figueras M. 2010b. A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *The Plant Journal* 62: 277
- Serra O, Soler M, Hohn C, Franke R, Schreiber L, et al. 2009a. Silencing of *StKCS6* in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *J. Exp. Bot.* 60: 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 Physiol.* 149: 1050-60
- Shelton D, Stranne M, Mikkelsen L, Pakseresht N, Welham T, et al. 2012. Transcription Factors of Lotus: Regulation of Isoflavonoid Biosynthesis Requires Coordinated Changes in Transcription Factor Activity. *Plant Physiology* 159: 531-47
- Shen H, Yin Y, Chen F, Xu Y, Dixon R. 2009. A Bioinformatic Analysis of NAC Genes for Plant Cell Wall Development in Relation to Lignocellulosic Bioenergy Production. *BioEnergy Research* 2: 217-32
- Shepherd T, Wynne Griffiths D. 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171: 469-99

- Shi J, Blundell TL, Mizuguchi K. 2001. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *Journal of Molecular Biology* 310: 243
- Shi JX, Malitsky S, De Oliveira S, Branigan C, Franke RB, *et al.* 2011. SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs. *PLoS Genet* 7: e1001388
- Shimizu K, Hirose S, Noguchi T. 2007. POODLE-S: web application for predicting protein disorder by using physicochemical features and reduced amino acid set of a position-specific scoring matrix. *Bioinformatics* 23: 2337-38
- Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MCE, Zabeau M, Van de Peer Y. 2002. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13627-32
- Singh AK, Sharma V, Pal AK, Acharya V, Ahuja PS. 2013. Genome-Wide Organization and Expression Profiling of the NAC Transcription Factor Family in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA Research*
- Soler M. 2008. *Molecular genetics of cork formation*. Doctoral thesis thesis. Universitat de Girona, Girona. 94 pp.
- 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: 933
- 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: 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 Physiol* 144: 419-31
- Soliday CL, Kolattukudy PE, Davis RW. 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: 607-14
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. 1996. The No Apical Meristem Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries. *Cell* 85: 159
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M. 2001. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127-35
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-39
- Taoka K-i, Yanagimoto Y, Daimon Y, Hibara K-i, Aida M, Tasaka M. 2004. The NAC domain mediates functional specificity of CUP-SHAPED COTYLEDON proteins. *The Plant Journal* 40: 462
- The Potato Genome Sequencing Consortium, Xu X, Pan S, Cheng S, Zhang B, *et al.* 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475: 189-95
- The Tomato Genome Consortium, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Hideki Hirakawa, Erika Asamizu, *et al.* 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-41
- To A, Joubès J, Barthole G, Lécureuil A, Scagnelli A, *et al.* 2012. WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 24: 5007-23
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart NJ. 2005. The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses. *The Plant Journal* 43: 153
- Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, *et al.* 2004. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell Online* 16: 2481-98
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, *et al.* 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-604
- Tusnády GE, Simon I. 1998. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *Journal of Molecular Biology* 283: 489

- Vermeer JEM, von Wangenheim D, Barberon M, Lee Y, Stelzer EHK, *et al.* 2014. A Spatial Accommodation by Neighboring Cells Is Required for Organ Initiation in Arabidopsis. *Science* 343: 178-83
- Viallette-Guiraud ACM, Adam H, Finet C, Jasinski S, Jouannic S, Scutt CP. 2011. Insights from ANA-grade angiosperms into the early evolution of *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes. *Annals of Botany*
- Vogt E, Schönherr J, Schmidt HW. 1983. Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* 158: 294
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MACJ, de Vries SC. 2003. The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* Gene Is Required for Boundary and Shoot Meristem Formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 1563-77
- Wang N, Zheng Y, Xin H, Fang L, Li S. 2013. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports* 32: 61-75
- Wang Xe, Basnayake BMVS, Zhang H, Li G, Li W, *et al.* 2009. The Arabidopsis ATAF1, a NAC Transcription Factor, Is a Negative Regulator of Defense Responses Against Necrotrophic Fungal and Bacterial Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1227
- Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, *et al.* 2010. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research* 38: W214-W20
- Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B. 2004. *CUPULIFORMIS* establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131: 915-22
- Wilkins M, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J, Williams K, *et al.* 1999. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol.* 112: 531-52
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2: e718
- Wu R, Li S, He S, Waßmann F, Yu C, *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: 3392-411
- Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, *et al.* 2009. Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res* 19: 1279
- Xia N, Zhang G, Liu X-Y, Deng L, Cai G-L, *et al.* 2010. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* 37: 3703-12
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua N-H. 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* 14: 3024-36
- Xie Q, Guo H-S, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua N-H. 2002. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419: 167
- Xie Q, Sanz-Burgos A, Guo H, García J, Gutiérrez C. 1999. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* 39: 647
- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M. 2005. Transcription Factors in Rice: A Genome-wide Comparative Analysis between Monocots and Eudicots. *Plant Molecular Biology* 59: 191-203
- Xu Z-Y, Kim SY, Hyeon DY, Kim DH, Dong T, *et al.* 2013. The Arabidopsis NAC Transcription Factor ANAC096 Cooperates with bZIP-Type Transcription Factors in Dehydration and Osmotic Stress Responses. *The Plant Cell Online*
- Xue G-P. 2005. A CELD-fusion method for rapid determination of the DNA-binding sequence specificity of novel plant DNA-binding proteins. *The Plant Journal* 41: 638
- Yamaguchi M, Goue N, Igarashi H, Ohtani M, Nakano Y, *et al.* 2010. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System. *Plant Physiol.* 153: 906-14

- Yamaguchi M, Kubo M, Fukuda H, Demura T. 2008. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *The Plant Journal* 55: 652-64
- Yamaguchi M, Mitsuda N, Ohtani M, Ohme-Takagi M, Kato K, Demura T. 2011. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *The Plant Journal* 66: 579
- Yang W, Bernards MA. 2007. Metabolomic Analysis of Wound-Induced Suberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Metabolomics* 3: 147-59
- Yeats TH, Rose JKC. 2013. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*
- Yoshii M, Shimizu T, Yamazaki M, Higashi T, Miyao A, et al. 2009. Disruption of a novel gene for a NAC-domain protein in rice confers resistance to Rice dwarf virus. *The Plant Journal* 57: 615
- Zeier J, Schreiber L. 1997. Chemical Composition of Hypodermal and Endodermal Cell Walls and Xylem Vessels Isolated from *Clivia miniata* (Identification of the Biopolymers Lignin and Suberin). *Plant Physiology* 113: 1223-31
- Zeier J, Schreiber L. 1998. Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* 206: 349-61
- 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: 537
- Zhong R, Lee C, Ye Z-H. 2009. Functional Characterization of Poplar Wood-Associated NAC Domain Transcription Factors. *Plant Physiology* 152: 1044-55
- Zhong R, Richardson E, Ye Z-H. 2007. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Planta* 225: 1603
- Zhu M, Chen G, Zhou S, Tu Y, Wang Y, et al. 2014a. A New Tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) Transcription Factor, SINAC4, Functions as a Positive Regulator of Fruit Ripening and Carotenoid Accumulation. *Plant and Cell Physiology* 55: 119-35
- Zhu Q, Zou J, Zhu M, Liu Z, Feng P, et al. 2014b. In silico analysis on structure and DNA binding mode of AtNAC1, a NAC transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Modeling* C7 - 2117 20: 1-10
- Zhu T, Nevo E, Sun D, Peng J. 2012. Phylogenetic analyses unravel the evolutionary history of NAC proteins in plants. *Evolution* 66: 1833

Annexos

ANNEX I: Nivells de significació de l'anàlisi estadística de ceres i suberina

A continuació es mostren els valors de p obtinguts per mitjà de l'anàlisi estadística de la quantificació de les substàncies de ceres i suberina. S'especifica expressament si es tracta d'una comparació entre construccions o entre línies de plantes transformades. Les anàlisis es corresponen als gràfics del capítol 2.

En l'ANOVA s'ha realitzat diverses comparacions, una per a cada substància/monòmer, per tant, s'ha hagut de corregir els nivells de significació en relació al nombre d'anàlisis (correcció de Bonferroni). Així, en les ceres, es considera significatiu (*) un resultat de $p \leq 0,00167$, i molt significatiu (**) $p \leq 0,00003$, en el cas de les comparacions entre substàncies. En la comparació de classes de substàncies, $p \leq 0,0125$ i $p \leq 0,00025$, respectivament.

Per als monòmers de la suberina s'ha establert com a significatiu un resultat $p \leq 0,00139$ i molt significatiu $p \leq 0,00003$. En la comparació de classes de monòmers, els nivells s'han situat a $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,0002$, respectivament.

En els testos de normalitat i homoscedasticitat, s'indica només les línies o mutants amb una p significativa. La resta no tenen una p significativa.

Se subratlla els resultats de les anàlisis escollides, bé les corresponents a les dades de μg de compost \times mg de periderma⁻¹, bé les corresponents a les dades transformades de manera logarítmica \ln μg de compost \times mg de periderma⁻¹. En el cas de l'anàlisi de Kruskal-Wallis, ambdós resultats són idèntics.

Per a les anàlisis Post Hoc, s'ha escollit el test HSD de Tukey, amb un llindar de significació de 0,05 (0,005 per a un resultat molt significatiu). A la taula es mostra els nivells de significació de les línies o mutants amb una p significativa per a la comparació amb la salvatge. En cas d'haver hagut d'utilitzar Kruskal-Wallis, es mostren els nivells de significació de les comparacions Post Hoc per a les dades sense transformar.

Anàlisi de substàncies de les ceres per línies separades

Compost	Normalitat dels residus de les diferents línies		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	µg de compost × mg de periderma ⁻¹	ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹	µg de compost × mg de periderma ⁻¹	ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹	µg de compost × mg de periderma ⁻¹ / ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹		
Àcids							
C18	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C22	ns	ns	ns	ns	p=0,00229 / p=0,00075*	NSE43 p=0,032*	0,01677
C24	ns	ns	p=0,048	ns	p=0,00207 / p=0,00051*	NSC1 p=0,011*	0,00482
C26	ns	ns	p=0,048	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NO2 p=0,005** NO5 p=0,009* NO15 p=0,008* NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,001** NSC34 p<0,001**	0,00161
C28	ns	NO5 p=0,033	ns	ns	p=0,00281* / p=0,00159	NO2 p=0,023* NO5 p=0,019* NO15 p=0,011* NSC1 p=0,003**	0,01126
Alcans							
C21	ns	ns	p=0,004	p=0,080	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00019*
C23	ns	ns	p=0,001	p=0,002	p<0,00001 / p<0,00001	NSE43 p=0,001** NSE45 p=0,001** NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00028*
C25	ns	ns	p=0,010	p=0,012	p<0,00001 / p<0,00001	NSE43 p=0,003** NSE45 p=0,001** NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00021*
C27	ns	ns	p<0,001	p=0,023	p<0,00001 / p<0,00001	NSE43 p<0,001** NSE45 p<0,001** NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00025*
C29	NSC31 p=0,046	NSC31 p=0,049	p<0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSE43 p=0,006* NSC1 p<0,001** NSC31<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00019*
Èsters							
C16	NSC34 p=0,018	ns	p=0,008	p=0,002	ns / ns		ns
C18	ns	ns	0,044	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSE43 p=0,005* NSC1 p=0,011* NSC34 p=0,005**	0,00080
C20	ns	ns	p<0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,024* NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,004** NSC34 p<0,001**	0,00090
C21	ns	ns	p<0,001	p=0,014	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00010*
C22	ns	ns	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC34 p<0,005**	0,00445

Anàlisi de substàncies de les ceres per línies separades

Compost	Normalitat dels residus de les diferents línies		Homoscedasticitat		ANOVA $\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^1 / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^1$	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$			
C23	ns	ns	p=0,010	p=0,039	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	<u>0,00029*</u>
C24	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,035* NSC34 p<0,001**	0,00059
C25	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u> / ns		ns
C26	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00028
C27	<u>ns</u>	NSE45 p=0,047	<u>ns</u>	p=0,031	<u>ns</u> / ns		ns
C28	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001**	0,00028
C29	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u> / ns		0,02180
C30	ns	NO5 p=0,045	p=0,037	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,010* NSC34 p<0,001**	<u>0,00200*</u>
Alcohols							
C16	ns	ns	p=0,001	p=0,009	ns / ns		<u>ns</u>
C18	NSC34 p=0,025	NSC34 p=0,017	p=0,001	p=0,005	p=0,00093 / p=0,00136		<u>ns</u>
C22	ns	ns	p=0,004	p=0,024	p<0,00001 / p<0,00001	NO5=0,025* NSC1 p<0,001** NSC34 p=0,003**	<u>0,00108*</u>
C24	ns	<u>ns</u>	p=0,026	<u>ns</u>	p<0,00001 / <u>p<0,00001</u>	NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,046* NSC34 p<0,001**	0,00428
C26	NSE45 p=0,034	NSE45 p=0,047	ns	ns	p=0,00048 / p=0,00072		<u>ns</u>
C28	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u> / ns		ns

Taula 8: Anàlisi de substàncies de les ceres per línies separades

Anàlisi de substàncies de les ceres per tipus de transformació

Compost	Normalitat mutants residus		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		
Àcids							
C18	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C22	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C24	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C26	ns	ns	p=0,023	ns	p=0,00012 / p=0,00007**	NSC p<0,001**	p=0,00013
C28	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
Alcans							
C21	ns	ns	p=0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSC p<0,001**	<0,00001
C23	ns	ns	p<0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSE p<0,001** NSC p<0,001**	<0,00001**
C25	ns	ns	p=0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSE p<0,001** NSC p<0,001**	<0,00001
C27	ns	ns	p<0,001	p=0,014	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p=0,001**	p<0,00001**
C29	ns	ns	p<0,001	p=0,008	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001**	p=0,00001**
Èsters							
C16	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C18	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NO p=0,006* NSE p=0,036* NSC p=0,009*	p=0,00001
C20	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSE p<0,001** NSC p<0,001**	p=0,00001
C21	ns	ns	p=0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSC p<0,001**	p<0,00001
C22	NSC p=0,026	ns	p=0,042	ns	p<0,00008 / p<0,00013*	NSE p=0,012* NSC p=0,003**	ns
C23	ns	ns	p=0,031	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSC p<0,001**	p<0,00001
C24	ns	ns	p<0,001	p=0,015	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001**	p=0,00002**
C25	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C26	ns	ns	p<0,001	p=0,014	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001**	p=0,00001
C27	ns	ns	p=0,013	p=0,007	ns / ns		ns
C28	ns	ns	p<0,001	p=0,035	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001**	p=0,00002**
C29	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C30	ns	ns	p=0,001	ns	p<0,00001 / p<0,00001**	NSC p<0,001**	p=0,00004
Alcohols							
C16	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C18	ns	ns	ns	ns	p=0,00108* / p=0,00035		ns
C22	ns	ns	p=0,002	p=0,038	p=0,00035 / p=0,00010	NSC p=0,002**	p=0,00077*
C24	ns	ns	p=0,038	ns	p=0,00001 / p=0,00001**	NSC p<0,001**	p=0,00052
C26	ns	ns	ns	ns	p=0,00018* / p=0,00017	NSC p=0,002**	ns
C28	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns

Taula 9: Anàlisi de substàncies de les ceres per tipus de transformació

Anàlisi dels totals de les substàncies de les ceres per tipus de transformació

Tipus de total	Normalitat mutant		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-S
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		$\ln \mu\text{g comp/mg perid}$
Alcans	ns	<u>ns</u>	$p < 0,001$	<u>ns</u>	$p < 0,00001 / \underline{p < 0,00001}^{**}$	NSE $p < 0,001^{**}$ NSC $p < 0,001^{**}$	$p < 0,00001$
Àcids	NSE $p = 0,034$	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns / <u>ns</u>		ns
Esters	ns	<u>ns</u>	$p < 0,001$	$p = 0,015$	$p < 0,00001 / p < 0,00001$	NSC $p < 0,001^{**}$	<u>$p = 0,00002^{**}$</u>
Alcohols	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>$0,00876^*$</u> / $0,01153$		ns
Total	NSE $p < 0,001$	<u>ns</u>	$p < 0,001$	$p = 0,008$	$p < 0,00001 / p < 0,00001$	NSC $p < 0,001^{**}$	<u>$< 0,001$</u>

Taula 10: Anàlisi dels totals de les substàncies de les ceres per tipus de transformació

Anàlisi de substàncies de la suberina per línies separades

Compost	Normalitat dels residus de les diferents línies		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		
Àcids							
C18	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C20	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C22	ns	ns	p=0,007	p=0,033	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p=0,006** NSC31 p=0,012* NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,016*	<u>p=0,00050*</u>
C24	ns	ns	ns	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p=0,004** NSC34 p=0,001** NSC43 p=0,012*	p=0,00024
C26	NSC1 p=0,007	NSC1 p=0,009	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p=0,013** NSC34 p=0,003**	<u>p=0,00067*</u>
C28	NO16 p=0,028	NO16 p=0,036	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p=0,001** NSC34 p=0,001**	<u>p=0,00038*</u>
C29	ns	ns	p=0,014	p=0,015	ns / ns		ns
C30	NSE 43p=0,034	NSE43 p=0,033	p=0,035	ns	ns / p=0,01048		ns
Diàcids							
C18	ns	NSC1 p=0,050	ns	ns	<u>p=0,00006*</u> / p<0,00001	NSE43 p=0,002*	ns
C18:1	ns	ns	ns	p=0,013	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,013*	p=0,00017
C22	ns	ns	ns	ns	<u>p=0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC34 p=0,003*	ns
C24	DES p=0,028 NO15 p=0,017	DES p=0,033 NO15 p=0,019	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,004** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001**	<u>p=0,00032*</u>
C26	NO16 p=0,006	NO16 p=0,013 NSC1 p=0,016	p<0,001	p=0,018	p=0,00619 / p=0,00011		<u>p=0,00123*</u>
C28	ns	ns	p=0,010	ns	p<0,00001 / <u>p<0,00001</u>	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p<0,001**	p=0,00014
ω-hidroxiàcids							
C16	ns	ns	ns	ns	<u>p=0,00058*</u> / p=0,00056		ns
C18:1	ns	ns	ns	ns	<u>p<0,00001</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001**	p=0,00017
C20	DES p=0,028 NSC1 p=0,015	DES p=0,010 NSC1 p=0,008	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC1 p=0,046* NSC31 p=0,021* NSC34 p=0,011* NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,002**	<u>p=0,00072*</u>

Anàlisi de substàncies de la suberina per línies separades

Compost	Normalitat dels residus de les diferents línies		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	µg de compost × mg de periderma ⁻¹	ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹	µg de compost × mg de periderma ⁻¹	ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹	µg de compost × mg de periderma ⁻¹ / ln µg de compost × mg de periderma ⁻¹		
C22	NO5 p=0,046	NO5 p=0,047	ns	ns	ns / ns		ns
C24	ns	ns	p=0,011	p=0,044	p=0,00003 / p=0,00005	NSC31 p=0,024* NSE45 p<0,001**	ns
C26	ns	ns	p=0,008	p=0,029	p<0,00001 / p<0,00001**	NO16 p=0,048* NSC1 p=0,006** NSC31 p<0,001** NSC34 p=0,003** NSE43 p=0,031* NSE45 p<0,001**	<u>p=0,00027*</u>
C28	NSC34 p=0,016	NSC34 p=0,014	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NO16 p=0,002** NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p<0,001**	<u>p=0,00013*</u>
Alcohols							
C16	Des p=0,040 NSE45 p=0,018	Des p=0,026 NSE45 p=0,021	p<0,001	p<0,001	p<0,00001 / p=0,00359	NO5 p=0,013** NO15 p=0,002** NO16 p=0,003**	<u>p=0,00112*</u>
C18	NO5 p=0,015	NO5 p=0,021	ns	p<0,001	p<0,00001 / p=0,00002	NSC1 p=0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p=0,018*	p=0,00021
C19	ns	ns	ns	ns	<u>p<0,00001</u> / p<0,00001	NSC31 p=0,001** NSC34 p=0,002** NSE43 p=0,001** NSE45 p=0,016*	p=0,00065
C20	ns	ns	ns	ns	p= 0,00120* / p= 0,00121	NSC1 p=0,005**	ns
C22	ns	ns	ns	ns	ns		ns
C23	ns	ns	ns	ns	<u>p=0,00016*</u> / p=0,00030		ns
C24	ns	NSC1 p=0,044	ns	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p=0,005** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,001**	p=0,00032*
C26	ns	ns	ns	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p<0,001**	p=0,00020
C27	ns	ns	ns	ns	<u>p=0,00054*</u> / p=0,00031	NSC1 p=0,004** NSC34 p=0,006**	ns
C28	ns	ns	p=0,038	ns	p<0,00001 / <u>p<0,00001**</u>	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p<0,001**	p=0,00017
C29	NO16 p=0,021	NO16 p=0,025	ns	ns	ns / ns		ns
C30	ns	ns	ns	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC1 p<0,001** NSC31 p<0,001** NSC34 p<0,001** NSE43 p<0,001** NSE45 p=0,048*	p=0,00018

Anàlisi de substàncies de la suberina per línies separades

Compost	Normalitat dels residus de les diferents línies		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		
Àcid ferúlic							
cis	ns	NSE45 $p=0,036$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,00001 / ns$	NSC1 $p=0,003^{**}$ NSC31 $p=0,030^{*}$ NSC34 $p=0,002^{**}$	<u>$p=0,00027^{*}$</u>
trans	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>$p<0,00001^{**} / p<0,00001$</u>	NSC1 $p<0,001^{**}$ NSC31 $p<0,001^{**}$ NSC34 $p<0,001^{**}$ NSE43 $p<0,001^{**}$ NSE45 $p=0,007^{**}$	$p=0,00011$

Taula 11: Anàlisi de substàncies de la suberina per línies separades

Anàlisi de substàncies de la suberina per tipus de transformació

Compost	Normalitat mutants residus		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		
Àcids							
C18	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C20	NSC p=0,032	ns	ns	ns	p=0,00068 / p=0,00148*	NSE p=0,019*	ns
C22	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00001
C24	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p=0,001** NSE p=0,003**	p=0,00001
C26	ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p=0,002**	p=0,00001**
C28	ns	ns	ns	p<0,001	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p=0,001**	p=0,00001
C29	ns	ns	ns	ns	p=0,00052* / p=0,00094	NSC p=0,043*	ns
C30	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
Diàcids							
C18	ns	ns	ns	ns	p=0,00111* / p=0,00127	NSE p=0,018*	ns
C18:1	NSC p=0,036	NSC p=0,041	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001**
C22	NSE p=0,018	NSE p=0,029	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001**	p=0,00023*
C24	DES p=0,028	DES p=0,033	p=0,005	p=0,004	p<0,00001 / p<0,00001	NSE p=0,025* NSC p<0,001**	p=0,00026*
C26	NO p=0,007	NSC p=0,029	ns	ns	ns / p=0,00032		p=0,00021*
C28	ns	ns	p=0,001	p=0,003	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p=0,001** NSE p<0,001**	p=0,00001**
ω-hidroxiàcids							
C16	ns	ns	ns	ns	ns / p=0,00108		ns
C18:1	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p=0,001**	p=0,00001
C20	DES p=0,028 NO p=0,012 NSC p=0,007	DES p=0,010 NSC p=0,003	ns	ns	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00001**
C22	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C24	ns	ns	p=0,003	p=0,007	ns / ns		ns
C26	ns	ns	p=0,001	p=0,002	p=0,00001 / p<0,00001	NSC p=0,003** NSE p<0,001**	p=0,00012*
C28	ns	ns	p=0,008	p<0,001	p<0,00001 / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001**
Alcohols							
C16	Des p=0,040	Des p=0,026	p<0,001	p<0,001	p<0,00001 / p<0,00001	NO p<0,001**	p=0,00004*
C18	ns	NSE p=0,014	ns	p=0,003	p<0,00001** / p=0,00002	NSE p=0,004** NSC p<0,001**	p=0,00001
C19	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00004
C20	ns	ns	ns	ns	p=0,00029* / p=0,00027		p=0,00112
C22	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C23	ns	ns	ns	ns	p=0,00007* / p=0,00014	NSC p=0,008**	ns
C24	NO p=0,037	NO p=0,040	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00001
C26	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001
C27	ns	ns	ns	ns	ns / ns		ns
C28	ns	ns	ns	p=0,028	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001
C29	NSC p=0,050	ns	ns	ns	p=0,00018 / p=0,00009*		p=0,00022
C30	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001

Anàlisi de substàncies de la suberina per tipus de transformació

Compost	Normalitat mutants residus		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-W
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		
Àcid ferúlic							
cis	ns	ns	p=0,010	p=0,001	p<0,00001 / ns	NSC p<0,001**	p=0,00001**
trans	ns	ns	ns	ns	p<0,00001** / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p<0,00001

Taula 12: Anàlisi de substàncies de la suberina per tipus de transformació

Anàlisi dels totals de les substàncies de la suberina per tipus de transformació

Tipus de total	Normalitat mutant		Homoscedasticitat		ANOVA	Post Hoc (HSD de Tukey)	K-S
	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$	$\mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1} / \ln \mu\text{g de compost} \times \text{mg de periderma}^{-1}$		$\ln \mu\text{g comp/mg perid}$
Àcids	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	p=0,008	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC p=0,001**	p=0,00088
Diàcids	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	p=0,00004* / p=0,00003	NSC p=0,029*	p=0,00466
ω -hidroxiàcids	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00013
Alcohols	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00018
Àcid ferúlic	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00011
Total	<u>ns</u>	ns	<u>ns</u>	ns	<u>p<0,00001**</u> / p<0,00001	NSC p<0,001** NSE p<0,001**	p=0,00013

Taula 13: Anàlisi dels totals de les substàncies de la suberina per tipus de transformació

ANNEX II: Taula d'encebadors utilitzats

Purpose	Application	Step	Target	Forward primer	Reverse primer	F/R optimal concentration (nM)	Amplicon size (b)
StNAM002 promoter cloning	Cloning	Cloning into pDONR207	StNAM002 promoter	GGGGACAAGTTTGT ACAAAAAGCAGGC TAAATACCAAGAAAT TGATACATGC	GGGACCACCTTTGTA CAAGAAAGCTGGGT GAAGATTTCTCTCT TTATATGACA		
StNAM002 promoter cloning	Confirmation	pDONR207 cloning confirmation	pDONR207	TGCGGTTAACGCTAG CATGGATCTC	TGTAACATCAGAGAT TTTGAGACAC		
StNAM002 promoter cloning	Cloning	Cloning into pKGWFS7	pDONR207	TGCGGTTAACGCTAG CATGGATCTC	TGTAACATCAGAGAT TTTGAGACAC		
StNAM002 promoter cloning	Confirmation	pKGWFS7 cloning confirmation (designed by Pau Boher Genis)	pKGWFS7	GCAATAATGGTTTCT GACG	CATGAAGCAGCACG ACTTC		
Relative quantification	qPCR		StNAM002	GAAAAAAGATTGTC ATATAATGGAG	ACTGATGAAAGATTA GAGCTTACC	300/300	
Relative quantification	qPCR		Apt	GAAACCGGAGCAGGT GAAGAA	GGAAGCAATCCCAG CGATACG	300/300	
Relative quantification	qPCR		FHT	GTTTGTGCATGAACC ATTGC	TTCAGGCTTTGGTGG ATTTTC	300/300	
Relative quantification	qPCR		CYP86A33	CCCTGAAACCCCTTC ACCAA	TGGCTTCAGTGGCTG AATCAA	300/300	
Transformant confirmation	Confirmation	Confirmation PCR	GUS	CAACGAACTGAAC GGCAGA	GGCACAGCACATCA AAGAGA		986

Taula 14: Taula d'encebadors utilitzats en aquesta tesi

