

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. Introducción | 1 |
| I.1. El sistema defensivo de las plantas | 1 |
| I.1.1. Consideraciones generales | 1 |
| I.1.2. La percepción del patógeno | 5 |
| I.1.2.1.- El reconocimiento inespecífico: elicitores o PAMPs. | 5 |
| I.1.2.2.- El reconocimiento específico: la interacción gen a gen | 6 |
| I.1.3. La respuesta de la planta | 7 |
| I.1.3.1.- Las respuestas defensivas locales..... | 7 |
| I.1.3.2.- Las respuestas defensivas sistémicas..... | 10 |
| I.1.4. Las rutas de señalización de la respuesta defensiva en la planta | 12 |
| I.1.4.1. La ruta del ácido salicílico (SA) | 12 |
| I.1.4.2. La ruta del ácido jasmónico (JA)..... | 16 |
| I.1.4.3. La ruta del etileno (ET)..... | 19 |
| I.1.4.4. Interacciones entre las rutas de señalización patogénica | 22 |
| I.1.4.5. La ruta del ácido gentísico (GA)..... | 24 |
| I.2. El metabolismo secundario en el sistema defensivo de las plantas | 26 |
| I.2.1. Terpenos | 26 |
| I.2.1.1. Biosíntesis de los terpenos | 27 |
| I.2.1.2. Los terpenos en el sistema defensivo de las plantas | 29 |
| I.2.2. Alcaloides..... | 31 |
| I.2.2.1. Biosíntesis de los alcaloides..... | 31 |
| I.2.2.2. Los alcaloides en el sistema defensivo de las plantas..... | 34 |
| I.2.3. Fenilpropanoides | 35 |
| I.2.3.1. Biosíntesis de los fenilpropanoides: la ruta del ácido shikímico..... | 35 |
| I.2.3.2. Metabolismo de las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico: fisiología y bioquímica..... | 39 |
| I.2.3.3. Los fenilpropanoides en el sistema defensivo de las plantas: importancia de las HCAAs | 44 |
| II. Objetivos | 47 |
| III. Materiales y Métodos | 49 |
| III.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos | 49 |
| III.2. Inoculación del material vegetal y recogida de muestras..... | 50 |
| III.2.1. Hojas enteras | 51 |
| III.2.2. Manchas necróticas y zona alrededor de las mismas | 51 |

| | |
|--|-----------|
| III.3. Extracción de compuestos fenólicos | 52 |
| III.3.1. Compuestos fenólicos libres | 52 |
| III.3.2. Compuestos fenólicos conjugados | 52 |
| III.4. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de plantas | 54 |
| III.4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> | 54 |
| III.4.2. Purificación de plásmidos bacterianos | 54 |
| III.4.3. Aislamiento y purificación de RNA de plantas..... | 54 |
| III.4.4. Reacciones de amplificación (RT-PCR) | 54 |
| III.4.5. Secuenciación de DNA | 55 |
| III.4.6. Aplicaciones bioinformáticas..... | 55 |
| III.5. Técnicas de análisis, síntesis, cuantificación e identificación de metabolitos..... | 56 |
| III.5.1. Análisis y cuantificación de las muestras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)..... | 56 |
| III.5.2. Análisis de la producción de etileno mediante técnicas de cromatografía gaseosa..... | 56 |
| III.5.3. Identificación de metabolitos mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas acopladas (HPLC-MS) | 57 |
| III.5.4. Síntesis de las HCAAs | 57 |
| III.5.5. Elaboración de curvas patrón de las HCAAs para su cuantificación | 59 |
| III.6. Ensayos de actividades in vitro de las HCAAs..... | 60 |
| III.6.1. Ensayo de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> | 60 |
| III.6.2. Ensayo de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> | 60 |
| III.7. Obtención de plantas transgénicas..... | 61 |
| III.7.1. Obtención del cDNA del gen <i>THT1-3</i> de tomate..... | 61 |
| III.7.2. Fusión de la región directa del gen <i>THT1-3</i> al promotor doble del CAMV35S..... | 61 |
| III.7.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 62 |
| III.7.4. Transformación genética de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 62 |
| III.7.5. Transformación genética de plantas de tomate | 63 |
| III.7.6. Estudios <i>in situ</i> de la actividad β -glucuronidasa..... | 63 |
| IV. Resultados y discusión | 65 |
| IV.1. Caracterización de cuatro amidas derivadas del ácido hidroxicinámico en tomate ‘Rutgers’ infectado con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>..... | 65 |
| IV.1.1. La infección de plantas de tomate ‘Rutgers’ con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> induce la acumulación de cuatro compuestos de naturaleza fenólica..... | 65 |

| | |
|--|------------|
| IV.1.2. Estudio de los espectros de masas y de absorbancia de los compuestos 1, 2, 3 y 4 inducidos por la infección de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | 68 |
| IV.1.3. Acumulación de las HCAAs en tomate infectado con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | 77 |
| IV.2. La inducción de la tiramina hidroxicinamoil transferasa (THT) precede la acumulación de CD, FD, CT y FT..... | 81 |
| IV.3. Estudio de la posible implicación del ácido salicílico (SA) y del etileno (ET) en la inducción patogénica de las HCAAs..... | 83 |
| IV.3.1. La activación de la síntesis de las HCAAs sigue una vía independiente de SA..... | 83 |
| IV.3.2. El etileno es esencial para la inducción de la expresión del gen <i>THT</i> y para la acumulación de las HCAAs | 85 |
| IV.4. CD y FD poseen actividad antioxidante | 90 |
| IV.5. CD y FD poseen actividad antibacteriana | 90 |
| IV.6. Sobreexpresión del gen de la tiramina hidroxicinamoil transferasa (THT) en plantas transgénicas | 93 |
| IV.6.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo para la sobreexpresión de la <i>THT</i> | 93 |
| IV.6.1.1. Obtención de plantas transgénicas | 93 |
| IV.6.1.2. Estudio de la acumulación de HCAAs en plantas 35S2X:: <i>THT</i> ::nos de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 95 |
| IV.6.2. Sobreexpresión de la <i>THT</i> en plantas de tomate <i>Solanum lycopersicon</i> cv. UC82 | 99 |
| IV.6.2.1. Obtención de plantas de tomate portadoras de la construcción 35S2X:: <i>THT1-3</i> ::nos | 99 |
| IV.6.2.2. Estudio de la acumulación de HCAAs en plantas 35S2X:: <i>THT1-3</i> ::nos de tomate | 100 |
| V. Conclusiones..... | 103 |
| VI. Bibliografía..... | 105 |
| Anexos..... | 133 |
| Anexo I. Zacarés, L., López-Gresa, M.P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J.M., and Conejero, V. (2007) Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> Mol. Plant Microbe Interact. 20(11):1439-1448..... | 133 |

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

Introducción:

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diferentes tipos de ataque por agentes estresantes bióticos que afectan a las diversas partes de la planta | 2 |
| Figura 2. Naturaleza multicomponente de la respuesta defensiva | 4 |
| Figura 3. Modelo ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas | 7 |
| Figura 4. Rutas biosintéticas del ácido salicílico..... | 14 |
| Figura 5. Ruta de biosíntesis del ácido jasmónico | 17 |
| Figura 6. Ruta de biosíntesis del etileno..... | 20 |
| Figura 7. Interacción entre las diferentes rutas de señalización patogénica..... | 23 |
| Figura 8. Biosíntesis compartimentada del IPP y del DAMP | 28 |
| Figura 9. Alcaloides de plantas con diversos orígenes biosintéticos..... | 32 |
| Figura 10. Fenilpropanoides derivados de plantas | 36 |
| Figura 11. Metabolismo de los fenilpropanoides | 38 |
| Figura 12. Estructura química de algunas amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAAs) de plantas | 41 |
| Figura 13. Biosíntesis de la feruloiltiramina a partir de tirosina | 43 |
| Tabla 1. Interacción de GA y SA en diferentes interacciones planta-patógeno | 25 |

Materiales y Métodos:

| | |
|--|----|
| Figura 14. Conjugación de compuestos fenólicos en forma de α y β -glucósidos | 53 |
| Figura 15. Mecanismo de reacción de la síntesis química de las HCAAs | 58 |
| Figura 16. Curvas patrón para cada una de las HCAAs | 59 |
| Esquema 1. Zonas de recogida de muestras | 51 |
| Esquema 2. Construcción <i>pBI121::GUS::35S2X::cDNA::nos</i> | 62 |

Resultados:

| | |
|--|----|
| Figura 17. Plantas de tomate ‘Rutgers’ infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | 65 |
| Figura 18. Análisis por HPLC de los extractos metanólicos de hojas de tomate ‘Rutgers’ | 67 |
| Figura 19. Espectros de masas y de absorción en el UV relativos al compuesto 1 | 72 |
| Figura 20. Espectros de masas y de absorción en el UV relativos al compuesto 2 | 73 |
| Figura 21. Espectros de masas y de absorción en el UV relativos al compuesto 3 | 74 |

| | |
|---|-----|
| Figura 22. Espectros de masas y de absorción en el UV relativos al compuesto 4 | 75 |
| Figura 23. Patrón de acumulación de <i>p</i> -cumaroildopamina (CD), feruloildopamina (FD), <i>p</i> -cumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT) en tomate ‘Rutgers’ infectado con <i>Pseudomonas syringae</i> | 78 |
| Figura 24. Niveles de acumulación de las cuatro HCAAs en distintas zonas de las hojas de tomate ‘Rutgers’ infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> | 79 |
| Figura 25. Patrón de acumulación de <i>THT</i> | 82 |
| Figura 26. Análisis de compuestos fenólicos en plantas de tomate <i>NahG</i> infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | 84 |
| Figura 27. Efecto del AVG en la acumulación de <i>p</i> -cumaroildopamina (CD), feruloildopamina (FD), <i>p</i> -cumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT) y del transcrito <i>THT</i> , en plantas de tomate ‘Rutgers’ infectadas con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | 87 |
| Figura 28. Efecto del tratamiento con etileno en la inducción del mRNA de la <i>THT</i> y la acumulación de <i>p</i> -cumaroildopamina (CD), feruloildopamina (FD), <i>p</i> -cumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT), en plantas de tomate ‘Rutgers’ | 89 |
| Figura 29. Ensayo de la actividad antibacteriana de <i>p</i> -cumaroildopamina (CD), feruloildopamina (FD), <i>p</i> -cumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT) | 92 |
| Figura 30. Acumulación de <i>At2g39030</i> en hojas de <i>Arabidopsis</i> infectadas con la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> | 94 |
| Figura 31. Acumulación del mRNA del isoenzima <i>THT1-3</i> en las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> 1, 2, 3, 4 y 5..... | 95 |
| Figura 32. Análisis de la acumulación de compuestos fenólicos en las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 97 |
| Figura 33. Ruta biosintética del ácido sinápico | 98 |
| Figura 34. Acumulación del mRNA del isoenzima <i>THT1-3</i> en las líneas transgénicas de tomate 11.1, 11.2, 12.3, 34.1, 35.1 y 38.1, y en dos controles no transgénicos | 99 |
| Figura 35. Niveles de acumulación de <i>p</i> -cumaroiltiramina en las líneas transgénicas 11.1, 11.2, 12.3, 34.1, 35.1 y 38.1 comparadas con las líneas control (C1 y C2) | 100 |
| Tabla 2. Cuantificación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de <i>p</i> -cumaroildopamina (CD), feruloildopamina (FD), <i>p</i> -cumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT), y de sus precursores (ácidos cumárico y ferúlico, tiramina y dopamina)..... | 91 |