



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Aproximación Proteómica y Metabolómica de la
Producción de Metabolitos Secundarios en
Líneas Celulares Elicitadas de *Solanum*
Lycopersicum

Dña. Zuleika Coromoto Briceño de Lara
2014



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Aproximación proteómica y metabolómica de la
producción de metabolitos secundarios en
líneas celulares elicidadas de *Solanum
lycopersicum***

**Dña. Zuleika Coromoto Briceño de Lara
2014**

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia y en el Dpto. de Ciencia y Tecnología Agraria y en el Instituto de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena con la ayuda de una beca otorgada por la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (Venezuela). El trabajo ha sido financiado por la Consejería de Educación, Ciencia e Investigación de la Región de Murcia (BIO-BVA 07/01-0003) y por la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la CARM en el marco de II PCTRM 2007-2010 (08799/PI/08).

Los resultados de la presente Memoria han sido incluidos en los siguientes trabajos de investigación:

Artículo original de investigación derivado de la tesis

Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA. (2012). Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 169:1050-1058.

Comunicaciones a congresos

Sabater-Jara A.B., Briceño Z., Belchí-Navarro S., Almagro L., Ferrer M.A., Pedreño M.A., Calderón A.A. (2008) Production of secondary metabolites and extracellular proteins in *Lycopersicon esculentum* elicited cell lines (Comunicación) FESPB. Tampere (Finlandia).

Briceño Z., Belchí-Navarro S., Almagro L., Pedreño M.A., Ferrer M.A., Calderón A.A (2009). Análisis de proteínas en suspensiones celulares de *Solanum lycopersicum* elicidadas.(Comunicación) VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales. Murcia.

Briceño Z. Martínez-Pérez A., Pedreño M.A., Ferrer M.A., Calderón A.A. (2011). Enhanced antioxidant phenol production by combined elicitor treatment in Micro-Tom cell cultures (Comunicación). XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. XIX de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana.

Agradecimientos

Es difícil expresar con palabras la liberación emocional que significa acabar y presentar, por fin, esta Tesis Doctoral. No solo para mí, sino para los míos, sobre todo aquellos que me han acompañado a lo largo de este viaje, animándome constantemente en esta etapa de mi vida. Han sido muchas las personas que me han brindado su ayuda y han colaborado de alguna manera u otra en la ejecución de este trabajo. A todos ustedes, quiero expresarles toda mi gratitud.

Ante todo, agradezco a Dios y a la virgen María por estar siempre presente a donde quiera que voy.

A mis directores de Tesis, Dra. María Ángeles Ferrer y Dr. Antonio Calderón, en primer lugar, mi más profundo agradecimiento, por aceptarme como Tesista y por haberme brindado la oportunidad de realizar y animarme en los momentos más difíciles a darle fin a esta tesis, gracias a su apoyo, a sus constantes orientaciones y a su infinita confianza, fue posible llegar a la meta. Gracias.

A mi tutora académica, Dra. María Ángeles Pedreño, por recibirme en su equipo de Investigación y por sus orientaciones científicas, que le dieron punto de partida a este trabajo de investigación. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio de la Universidad de Murcia y de la UPCT:

A Sarai, por su ayuda durante el periodo de adaptación en el laboratorio de Murcia y su paciencia a la hora de montar los experimentos y en especial los geles de electroforesis. Gracias.

A Lorena, Ana y Laura por la ayuda y asesoría con los ensayos. Gracias.

A Asen, compañera con quien compartí agradables charlas en el laboratorio de M. Ángeles y Antonio. Gracias.

A la UCLA, quien me otorgó el apoyo financiero a este Doctorado. Gracias.

A todos mis amigos en especial a Ingrid y Gosmyr y a mis familiares que de alguna u otra manera me han apoyado en este reto. Gracias.

Por último, y no por ello menos importante, a mi querida familia: a mi madre por sus palabras sabias y de aliento constante. A mi compañero de vida mi amado Luis por la paciencia y el apoyo que en todo momento recibo. A mis hijas quienes viven día a día un pedacito de esta tesis, en especial Zuleyka María por la paciencia que me tuvo y sus asesorías constantes en la parte informática de esta tesis. Gracias familia por confiar en mi, los amo.

*A mi amada familia
y a mi patria Venezuela*

“Valora el momento presente. Aférrate a cada momento de tu vida y saboréalo”.
(Wayne Dyer)

*“Haz sólo lo que amas y serás feliz.
El que hace lo que ama, está benditamente coronado al éxito,
que llegará cuando deba de llegar, porque lo que debe ser,
será y llegará naturalmente”.*
(Facundo Cabral)

Índice

Abreviaturas	i
Introducción	1
I. El tomate.....	3
I.1. Importancia económica del cultivo de tomate.....	3
I.2. Origen y domesticación.....	4
I.3. Taxonomía y Morfología.....	5
I.4. <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	6
II. Metabolismo secundario en plantas.....	9
II.1. Compuestos fenólicos.....	11
II.1.1. Generalidades.....	11
II.1.1.1. Compuestos fenólicos en tomate.....	16
II.1.2. Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	17
II.1.3. Funciones fisiológicas de los compuestos fenólicos	24
II.1.4. Peroxidasas.....	26
II.2. Terpenoides o isoprenoides.....	28
II.2.1. Generalidades.....	28
II.2.1.1. Compuestos terpenoides en tomate.....	29
II.2.2. Ruta biosintética de los terpenoides en plantas.....	29
II.2.2.1. Ruta del ácido mevalónico (MVA).....	30
II.2.2.2. Ruta del metileritritol-4-fosfato (MEP).....	32
II.2.3. Esteroles vegetales o fitosteroles.....	32
II.2.3.1. Biosíntesis de los fitosteroles.....	33
II.2.3.2. Funciones fisiológicas de los fitosteroles.....	34
III. Producción de metabolitos secundarios por cultivo <i>in vitro</i>	36
IV. Elicitación como herramienta para la obtención de metabolitos secundarios.....	38
IV.1. Elicitación con jasmonato de metilo.....	40
IV.2. Elicitación con oligosacáridos cíclicos (ciclodextrinas).....	42
V. Proteínas extracelulares.....	46
V.1. Proteínas relacionadas con la patogénesis.....	48
Objetivos	53
Materiales y Métodos	57
I. Reactivos.....	59
II. Material vegetal.....	59
II.1. Iniciación de la línea celular.....	59
II.2. Mantenimiento de los callos e iniciación y mantenimiento de las suspensiones	

celulares.....	61
III. Medida del crecimiento celular.....	62
IV. Elicitación de las suspensiones celulares.....	64
IV.1. Elicitación con CDs y/o MJ	64
V. Determinación de la viabilidad celular.....	66
V.1. Determinación de la viabilidad celular con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC).....	66
V.2. Determinación de la viabilidad celular con diacetato de fluoresceína (DAF).....	67
VI. Extracción de metabolitos.....	67
VI.1. Extracción de metabolitos en medio extracelular en suspensiones celulares elicitadas y control.....	67
VI.2. Extracción de metabolitos intracelulares procedentes de suspensiones elicitadas y control.....	68
VII. Evaluación de metabolitos secundarios.....	68
VII.1. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios con cromatografía HPLC-MS y CG-MS.....	68
VII.2. Estimación del contenido de fenoles solubles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	70
VIII. Determinaciones enzimáticas en el medio extracelular e intracelular.....	70
VIII.1. Extracción de proteínas intracelulares y extracelulares.....	70
VIII.2. Medida de la actividad peroxidasa	71
VIII.3. Medida de la actividad fenil alanina amonio liasa.....	72
VIII.4. Medida de la actividad endoquitinasa.....	72
VIII.5. Medida de la actividad 1,3- β -glucanasa.....	73
IX. Determinación de la concentración de proteína total utilizando el reactivo de Bradford.....	74
X. Determinaciones electroforéticas.....	74
X.1. Determinación del patrón isoenzimático mediante isoelectroenfoque analítico.....	74
X.2. Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	75
XI. Análisis proteómico.....	77
XI.1. Microsecuenciación de bandas de proteínas del medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	77
XI.1.1. Espectrometría de masas ESI.....	77

XII. Análisis estadísticos.....	78
Resultados y Discusión.....	79
I. Caracterización de las suspensiones celulares de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	81
I.1. Medida del crecimiento celular de suspensiones celulares de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	83
I.2. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	85
I.3. Estudio de metabolitos secundarios de suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	86
I.3.1. Evolución de los niveles de compuestos fenólicos durante el crecimiento de suspensiones celulares de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	86
I.3.2. Evolución de los niveles de terpenoides durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	91
I.4. Análisis de la expresión proteica durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	94
I.4.1. Evolución del patrón de proteínas extracelulares e intracelulares totales en suspensiones de tomate cv. MT.....	94
I.4.2. Evolución del patrón isoenzimático de peroxidasas extracelulares e intracelulares en suspensiones de tomate cv. MT.....	97
I.4.3. Evolución de la actividad peroxidasa soluble en el medio extracelular y en células en suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	100
II. Análisis de metabolitos en cultivos celulares de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom) elicitados con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas.....	105
II.1. Efecto del jasmonato de metilo y ciclodextrinas, por separado en combinación, sobre el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT....	107
II.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre la producción de terpenoides en suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	111
II.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en suspensiones celulares de tomate cv. MT elicitadas con jasmonato de metilo y ciclodextrinas....	116
II.3.1. Efecto del jasmonato de metilo y ciclodextrinas, separado o en combinación sobre el contenido de fenoles solubles totales en suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	116
II.3.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre el contenido	

de fenoles individuales en suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	119
III. Análisis del proteoma en cultivos celulares de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom) elicitados con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas.....	123
III.1. Patrón isoenzimático de peroxidasas extracelulares e intracelulares de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidadas con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas solas o en combinación.....	125
III.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre la actividad peroxidasa extracelular e intracelular en suspensiones celulares de tomate cv. MT.	127
III.3. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas solas o en combinación sobre la actividad fenilalanina amonio liasa intracelular en suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	128
III.4. Patrón proteínas totales extracelulares e intracelulares de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidadas con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas..	130
III.5. Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidadas con jasmonato de metilo y ciclodextrinas.....	133
III.6. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre las actividades endoquitinasa y β -1,3-glucanasa en el medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT.....	143
Conclusiones	147
Bibliografía	153

Abreviaturas

- 2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 4CL:** 4-cumarato:CoA ligasa
- 4-MN:** 4-metoxi- α -naftol
- ACX:** acil-CoA oxidasa
- AIA:** ácido indolacético
- ANA:** ácido 1-naftalenacético
- AOC:** aleno óxido ciclasa
- AOS:** aleno óxido sintasa
- ANS:** antocianidín sintasa
- AS:** antocianina sintasa
- 13-AOS:** 13-aleno óxido sintasa
- BA:** 6-benciladenina
- CAD:** coniferil alcohol deshidrogenasa
- CAS:** cicloartenol sintasa
- CCoAOMT:** cafeoil-CoA *O*-metiltransferasa
- CCR:** *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa
- CDs:** ciclodextrina(s)
- CDsM:** β -ciclodextrinas metiladas al azar
- CDsH:** β -ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar
- CG-MS:** cromatografía de gases/masas
- CHR:** chalcona reductasa
- CHS:** chalcona sintasa
- cv.:** cultivar
- CA5H:** coniferilaldehído 5-hidroxilasa
- C'3H:** 5-*O*-(4-cumaroil) siquimato/quinato-3'hidroxilasa
- C4H:** cinamato-4-hidroxilasa
- d:** día
- DDT:** ditiotreitól
- DFR:** dihidroflavonol reductasa
- DHFR:** dihidroxiflavonol reductasa
- DHK:** dihidrokaemferol
- DHM:** formándose dihidromiricetina
- DMAPP:** dimetilalipirofosfato
- DMID:** 7,2'-dihidroxi, 4'-metoxisoflavanol deshidratasa

DXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato
DXR: deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
DXS: 1-deoxi-D-xilulosa 5- fosfato sintasa
EEC: matriz extracelular o espacio extracelular
EDTA-Na: etilendiaminotetraacetato de sodio
ESI: ionización por electrospray
F3OH: flavanona 3-hidroxilasa
FLS: flavonol sintasa
FPP: farnesilpirofosfato
FRET: transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
FS: flavona sintasa
F3H: flavanona 3-hidroxilasa
F3'H: P450: flavonoide 3-hidroxilasa
F3'5'H: P450: flavonoide 3'5-hidroxilasa
F5H: ferulato 5-hidroxilasa
GGPP: geranylgeranylpirofosfato
GPP: geranyl pirofosfato
h: hora(s)
HCA: ácido(s) hidrocínámico(s)
HCT: hidroxicinamoiltransferasa
HDR: hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa.
HDS: hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa
HMBPP: hidroximetilbutenil pirofosfato
HMG CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMG: 3-hidroxi-3-metilglutaril
HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa
HPLC-MS: cromatografía líquida de alta presión acoplado detector de espectrometría de masas
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
13-HPOTE: ácido (13*S*)-hidroperoxioctadecatrienoico
ICB: índice de crecimiento de la biomasa
IDI: isopentenil difosfato isomerasa
IEF: isoelectroenfoque
IPP: isopentenilpirofosfato
IFR: isoflavona reductasa

IFS: isoflavona sintasa

IOMT: isoflavone *O*-metiltransferasa

I2'H: isoflavona 2'- hidroxilasa

JA: ácido jasmónico

JMT: ácido jasmónico carboxil metiltransferasa

LC- ESI- MS/MS: cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización de electrospray

LC-FT-ICR-MS: cromatografía líquida acoplado detector de masas con un analizador de resonancia iónica ciclotrónica de iones, con transformada de Fourier

LCR: leucoantocianidín reductasa

LDOX: leucoantocianidín dioxigenasa

LOX: lipooxigenasa

MALDI-TOF-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo

MAB: meristemo apical del brote

MeOH: metanol

MEP: metileritritol 4-fosfato

min: minuto(s)

MJ: jasmonato de metilo

MS: Murashige y Skoog

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MVA: ácido mevalónico o mevalonato

MVD: mevalonato pirofosfato descarboxilasa

MVK: mevalonato quinasa

MT: Micro-Tom

NAcGlc: N-acetilglucosamina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO: óxido nítrico

OMT: *O*-metiltransferasa

OPDA: 12-oxo-*cis*-fitodienoico

OPR: *cis*(+)-12-oxofitodienoico reductasa

OSC: óxido de escualeno ciclasa

P450: citocromo P450

PAL: fenilalanina amonio liasa

PF: peso fresco

Phe: fenil alanina

pI: punto isoeléctrico
PMK: fosfomevalonato quinasa
PMSF: fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PQ: proteín quinasa
PVPP: polivinilpolipirrolidona
Pr: productividad de la biomasa
Proteínas PR: proteínas relacionadas con la patogénesis
Prx: peroxidasa
PS: peso seco
RE: retículo endoplasmático
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT: ramnosil transferasa
SA: ácido salicílico
SAD: sinapil alcohol deshidrogenasa
SAM: S-adenosil-L-metionin-esterol-C-metiltransferasa
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SO: escualeno epoxidasa
STS: estilbena sintasa
SS: escualeno sintasa
Ta: tiempo de agotamiento de los nutrientes
TAL: tirosina amonio liasa
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tyr: tirosina
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TMV: virus del mosaico del tabaco
Tr: tiempo de reacción
TTC: 2,3,5-trifenil tetrazolio
UFGT: UDP flavonoide glucosil transferasa
UV: ultravioleta
VEC: volumen de empaquetamiento celular
VEC_{max}: volumen de empaquetamiento celular máximo
VEC₀: volumen de empaquetamiento celular a tiempo cero
V_{exp}: velocidad de crecimiento celular en la fase exponencial
XEGIP: endoglucanasas fúngicas específicas del xiloglucano
VR: vestitona reductasa

α -CD: alfa ciclodextrina(s)

β -CD: beta ciclodextrina(s)

γ -CD: gamma ciclodextrina(s)

α -LeA: ácido α -linolénico

1. Introducción

I. El tomate

I.1. Importancia económica del cultivo de tomate

El tomate constituye uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica a nivel mundial. Es, con diferencia, al que más superficie se le dedica (4.700.000 ha) y del que más producción se obtiene, con 162,0 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012; <http://faostat.fao.org>). China, en 2012, con más de 50 Mt, fue el principal país productor de tomate, con una producción que representó el 31 % del total mundial, seguida por India, EE.UU., Turquía y Egipto. España ocupó la octava posición en la escala mundial en cuanto a producción (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Valores de producción de tomate (Mt) en distintos países según el informe de la FAOSTAT (2012)

País	Producción (Mt)	% Producción
China	50	30,9
India	17,5	10,8
Estados Unidos	13,2	8,1
Turquía	11,3	7,0
Egipto	8,6	5,3
Irán	6,0	3,7
Italia	5,1	3,1
España	4,0	2,5
Brasil	3,9	2,4
México	3,4	2,0

En España, el tomate es, junto con el melón, el cultivo hortícola que más superficie ocupa, con 59.300 ha, y es, con diferencia, la hortaliza de la que se obtiene mayor producción, de la cual casi el 50 % se destina a la industria. El cultivo del tomate está muy extendido por casi toda la geografía nacional. La mayor producción de tomate corresponde a Andalucía, seguida de Murcia, Canarias y la Comunidad Valenciana (MAGRAMA, 2012). El tomate es también, dentro del conjunto de frutas y hortalizas, el producto más exportado de nuestro país. Como hemos reseñado, este cultivo es especialmente relevante en el sur de España, de hecho, en la Región de Murcia están asentadas las principales compañías españolas líderes en producción y facturación de

tomate de mesa como el Grupo Hortofrutícola La Paloma, Frutas Esther y S.A.T. Durán (INFO, 2013).

La demanda de frutos de tomate aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y, en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada. El tomate es un fruto muy apreciado por sus características organolépticas de sabor y color. Su uso abarca desde el consumo en fresco o elaborados en forma de puré, sopa, zumo, frutos enteros, pelados o triturados, etc., todos ellos con alto grado de aceptación como ingredientes culinarios.

El fruto de tomate y los productos derivados de éste son considerados alimentos saludables por varias razones. Son bajos en grasas y en calorías, no contienen colesterol y constituyen una buena fuente de fibra. Son una excelente fuente de compuestos bioactivos de gran valor nutricional como ácido fólico, ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (provitamina A), tocoferoles (vitamina E), compuestos fenólicos, licopeno, luteína y macroelementos como potasio (Davies y Hobson, 1996), además de trazas de microelementos como selenio, cobre, manganeso y zinc, los cuales actúan como cofactores de enzimas antioxidantes (Martínez-Valverde et al., 2002). Según diversos estudios epidemiológicos, los carotenoides del tomate pueden reducir significativamente el riesgo de contraer enfermedades degenerativas, entre las que se incluyen varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas (Block et al., 1992; Agarwal y Rao, 2000; Giovannucci et al., 2002; Willcox et al., 2003; Ray et al., 2011, y referencias en el artículo).

1.2. Origen y domesticación

La domesticación del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se cree que se originó en la región andina, que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile, y en las Islas Galápagos (Nuez et al., 2004). Aunque el origen y la domesticación son dudosos, existen evidencias que señalan que esta especie, antes de su llegada a Europa y Asia, había alcanzado una fase de domesticación avanzada (Rick, 1976 y 1991; Foolad, 2007), ya que se han encontrado diversos grabados, pertenecientes a antiguos herbarios,

que revelan que los primeros tomates cultivados en Europa tenían frutos de un gran calibre (Jenkins, 1948; Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).

1.3. Taxonomía y morfología

El tomate pertenece a la familia Solanaceae, que comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2.700 especies. Linneo, en 1753, denominó al tomate cultivado *Solanum lycopersicum*, si bien, un año más tarde Miller incluyó al tomate en el género *Lycopersicon*. En un principio, el género *Lycopersicon* se distinguió del género *Solanum* por presentar el primero hojas pinnadas y dehiscencia lateral de las anteras, mientras que en el segundo las hojas tienden a ser simples y la dehiscencia de las anteras se produce por un poro apical. Las relaciones filogenéticas entre *Solanum* y *Lycopersicon* han sido objeto de numerosos estudios en los que se han analizado datos morfológicos, secuencias aminoacídicas de la plastocianina o de la subunidad pequeña de la enzima rubisco, flavonoides, ADN mitocondrial, cloroplástico y nuclear, etc. (Spooner et al., 1993, y otras referencias del artículo). En la actualidad, teniendo en cuenta tantos datos morfológicos y moleculares, se ha vuelto a reasignar el nombre de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado (Foolad, 2007, y referencias en el artículo).

El tomate es una planta que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta y el crecimiento es limitado (variedades determinadas) e ilimitado (variedades indeterminadas). Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias. La hoja es compuesta e imparipinnada, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado. La flor es perfecta, regular e hipógina, y consta de cinco o más sépalos verdes, suele tener el mismo número de sépalos que de pétalos, estos últimos de color amarillo. Los estambres se desarrollan fusionados, formando un cono estaminal que envuelve al gineceo (con un ovario bi- o plurilocular). Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso y se unen al eje de la inflorescencia por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión. El fruto es una baya carnosa bi- o plurilocular constituida por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Chamorro, 1995).

1.4. *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

El tomate cv. Micro-Tom (MT) fue desarrollado como planta ornamental a partir del cruce entre los cultivares Florida Basket y Ohio 4013 (Scott y Harbaugh, 1989). Este cultivar se caracteriza por presentar un ciclo biológico muy corto (70-90 días), un tamaño reducido debido a que presenta entrenudos de corta longitud y un claro fenotipo determinado (la planta completa mide entre 10 y 20 cm) y se puede cultivar a alta densidad, hasta 1.357 plantas/m² (Fig. 1.1) (Meissner et al., 1997). Estas propiedades, pequeño tamaño y ciclo biológico corto, son las idóneas para llevar a cabo estudios controlados en laboratorio, características que también cumplen otros modelos biológicos como *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Danio rerio*, entre otros. De hecho, el cultivar MT se ha utilizado como modelo de plantas que poseen frutos carnosos en estudios genéticos (Meissner et al., 1997; Mathews et al., 2003; Martí et al., 2006; Carvalho et al., 2011; Lombardi-Crestana et al., 2012), genómicos (Aoki et al., 2010; Dan et al., 2006; Matsukura et al., 2008), fisiológicos (Martí et al., 2006; Gómez et al., 2009) y metabolómicos (Ragab et al., 2006; Moco et al., 2006a y b, 2007; Iijima et al., 2008a y b; Slimestad y Verheul, 2009).

Teniendo en cuenta su genealogía, el fenotipo de MT es el resultado de dos mutaciones recesivas principales: *dwarf* (*d*) y *miniature* (*mnt*) (Meissner et al., 1997). Aunque mediante estudios de alelismo se ha sugerido que MT posee otra mutación en el gen *D* (Martí et al., 2006).

El fenotipo determinado de MT se debe a una mutación en el gen *SELF-PRUNING* (*SP*) (Martí et al., 2006). El gen *SP* pertenece a la familia *CETS* de genes reguladores que codifican una proteína moduladora de 23 kDa, que, a su vez, determina el potencial del meristemo apical para continuar creciendo. El gen *SP* controla el proceso mediante el cual las fases vegetativas y reproductivas alternan en el vástago simpodial del tomate.



Figura 1.1. Tamaño en el tiempo de floración de los cultivares de tomate Micro-Tom (MT), Ailsa Craig (A, un cultivar con fenotipo indeterminado) y Rutgers y UC-82 (R y U, dos cultivares con fenotipo determinado). Tomado de Martí et al. (2006).

Mientras que en las especies que exhiben una arquitectura monopodial el meristemo apical del brote (MAB) es indeterminado y los órganos vegetativos y reproductivos se generan en sus flancos, el MAB de tomate es determinado y el desarrollo del primer brote se completa cuando aparece la primera inflorescencia. A este primer brote se le denomina ‘segmento inicial’. A continuación se desarrolla un nuevo brote vegetativo del meristemo axilar más alto, es decir, un meristemo simpodial localizado en la axila de la hoja más joven justo por debajo de la inflorescencia. El meristemo simpodial permite a la planta continuar su crecimiento, desarrollando tres nudos vegetativos (hojas) antes de terminar en una nueva inflorescencia. Este patrón de crecimiento se repite a través de sucesivos segmentos determinados o unidades ‘simpodiales’. Por tanto, la arquitectura de la planta del tomate implica una alternancia regular de fases vegetativas y reproductivas entre el brote primario y los brotes axilares.

El gen *SP* controla la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo en los meristemos de la inflorescencia (Pnueli et al., 1998). La anulación de función del gen *SP* no tiene efectos en la arquitectura del segmento inicial, pero promueve una reducción gradual del número de nudos vegetativos que se generan en los sucesivos segmentos simpodiales (Pnueli et al., 1998). En este sentido, se ha podido comprobar que la sobreexpresión del gen *SP* en tomate da lugar a una extensión de la fase vegetativa en los brotes simpodiales (Pnueli et al., 1998). A pesar de las diferencias entre los sistemas monopodiales y simpodiales, los genes que mantienen el estado indeterminado del brote en *Arabidopsis thaliana* (*TFL1*; *TERMINAL FLOWER 1*) y en *Antirrhinum majus* (*CEN*, *CENTRORADIALIS*) son ortólogos al gen *SP* de tomate (Pnueli et al., 1998).

Mediante el etiquetado de transposones (*transposon tagging*) se ha logrado aislar el gen *DWARF (D)*. Este gen codifica una P450 implicada en la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides y cataliza la oxidación en C6 de la 6-deoxocastasterona para dar castasterona, que es el precursor del brasinoesteroide con mayor actividad biológica, el brasinólido (Bishop et al., 1996). Se ha comprobado que diversos genes homólogos al gen *D* de tomate aislados de *Arabidopsis* y de arroz también presentan actividad C-6 oxidasa (Martí et al., 2006). En tomate el gen *D* se expresa en todos los órganos, pero especialmente en los tejidos vegetativos y reproductivos en expansión, por lo que la mutación *d* se ha usado para la obtención de variedades de tomate enanas.

Aunque la mutación *mnt* no está bien caracterizada, se ha sugerido que está asociada a la señalización de giberelinas y que ésta no afecta al metabolismo de estas fitohormonas (Martí et al., 2006).

El tomate es susceptible a un gran número de enfermedades provocadas por hongos, bacterias, virus, viroides y nemátodos (Matsukura et al., 2008, y referencias en el artículo). En 2005, Takahashi et al. inocularon plantas del cv. MT con los principales agentes patógenos de tomate (10 hongos, 6 bacterias y 3 virus) y observaron que este cultivar es, en general, susceptible a la mayoría de estos patógenos, aunque es resistente a *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola* y *Fusarium oxysporum*. Además, en

otros estudios se ha descrito que MT es resistente a *Cladosporium fulvum*, que provoca la enfermedad llamada cladosporiosis, a la raza silvestre 1 de *Fusarium* y a *Stemphylium spp.* que provoca la mancha gris de la hoja (*grey leafspot*) (Martí et al., 2006, y referencias en el artículo).

II. Metabolismo secundario en plantas

Todas las células llevan a cabo reacciones bioquímicas esenciales y al conjunto de estas reacciones se le conoce como metabolismo primario, que conduce a la síntesis de las principales biomoléculas estructurales y energéticas: carbohidratos, lípidos y proteínas. A diferencia de otros organismos, las plantas son capaces de presentar un gran número de rutas biosintéticas secundarias que conducen a la producción de compuestos conocidos como metabolitos secundarios (Croteau et al., 2000).

El nombre de metabolito secundario es utilizado para referirse a aquellos compuestos naturales que son sintetizados y utilizados por las células, pero no son esenciales, dado que no participan directamente en el metabolismo primario, pero tienen un papel primordial en la supervivencia de las plantas, siendo algunas de sus funciones actuar como señales moleculares dentro de la planta o entre la planta y los microorganismos, en la defensa frente a herbívoros, otras plantas y animales, como atrayentes de insectos polinizadores y otros animales que dispersan las semillas (Kessler y Baldwin, 2002; Lattanzio et al., 2006), o frente a situaciones de estrés abiótico, como ozono, luz UV, salinidad, etc. (Winkel-Shirley, 2002; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

En relación con la defensa, en los últimos años se han presentado evidencias que sugieren que los metabolitos secundarios desempeñan, además, funciones auxiliares, entre las que se incluyen las relacionadas con el metabolismo primario y que su producción no tendría un coste directo sobre el metabolismo primario, al igual que se ha sugerido en animales (Neilson et al., 2013 y referencias en el artículo). Neilson et al. (2013) hacen hincapié en que los metabolitos secundarios pueden servir de compuestos de almacenamiento y pueden ser, por tanto, movilizados para compensar deficiencias en el metabolismo primario. En consecuencia, estos autores difieren del enfoque

ácido siquímico, y de los aminoácidos alifáticos, formados en el ciclo Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (Cheng et al., 2007).

Pese a la gran variedad de metabolitos secundarios existentes, el número de rutas biosintéticas es limitado, lo cual no las exime de una alta complejidad que se ve reflejada en varias etapas donde suelen intervenir factores transcripcionales y enzimas reguladoras, siendo esencial la presencia y concentración de moléculas precursoras e inhibidoras. Además, la biosíntesis de una determinada clase de metabolitos secundarios depende de la constitución genética de la planta, es decir está restringida a estados específicos del desarrollo del organismo, a células especializadas o a periodos de estrés de distinta naturaleza (Harborne, 1999; Winkel-Shirley, 2002).

II.1. Compuestos fenólicos

II.1.1. Generalidades

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los principales grupos de metabolitos secundarios. Aunque, por definición, todos estos compuestos poseen, al menos, un anillo aromático sustituido con uno o varios grupos hidroxilo (grupos que, a su vez, pueden reaccionar para dar lugar a la formación de ésteres, metil-éteres, glicósidos, etc.), se excluyen de este grupo compuestos cuya estructura principal deriva de otras rutas biosintéticas que dan origen a otros tipos de compuestos, tales como terpenoides, alcaloides, etc. Así pues, a la hora de definir los compuestos fenólicos, es preferible atender a consideraciones de origen biosintético, definiéndose estas sustancias como aquellas derivadas de dos rutas principales: La ruta del ácido siquímico, que da lugar a la formación de fenilalanina y, a través del metabolismo fenilpropanoide general, de fenilpropanos y derivados (Figura 1.3), y la del acetato-malonato, que puede originar fenoles simples y quinonas (Harborne, 1999; Taiz y Zeiger, 2010). La combinación de ambas rutas principales da lugar a la formación de los flavonoides, que es el subgrupo de compuestos fenólicos que presenta mayor diversidad y una distribución más amplia en el Reino Vegetal. Por lo tanto, la gran variedad estructural existente dentro de este grupo de metabolitos secundarios surge a partir de

un número limitado de precursores biosintéticos: fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato, acetil-CoA y malonil-CoA (Vogt, 2010).

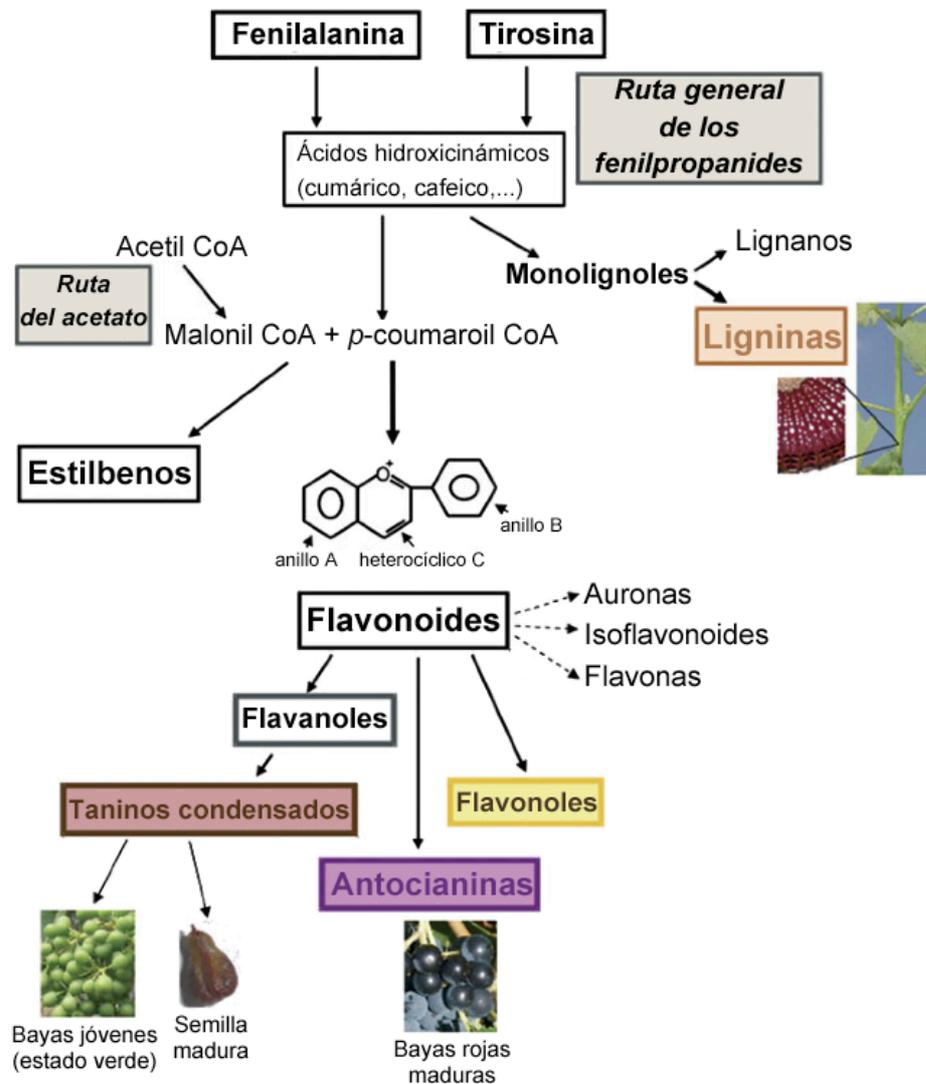


Figura 1.3. Ruta general biosintética de los compuestos fenólicos y sus principales subgrupos. Adaptado de Hichri et al., 2011.

Dentro de los compuestos fenólicos se pueden establecer varios subgrupos atendiendo al número de átomos de carbono y a la estructura del esqueleto fenólico básico (Tabla 1.2). Los ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3), entre los que se incluyen los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, presentan diferentes grados de hidroxilación y metilación en C_6 . La escisión de un fragmento de C_2 de la cadena lateral alifática del

ácido *p*-cumárico conduce a la formación de los ácidos hidroxibenzoicos (C₆-C₁), tales como salicílico, siríngico, gálico y vainílico (Harborne, 1999; Boudet, 2007; Taiz y Zeiger, 2010).

Tabla 1.2. Diferentes compuestos fenólicos presentes en las plantas. Adaptado de Robards et al. (1999) y Haminiuk et al. (2012).

Esqueleto básico	Clase	Ejemplos
C ₆	Fenoles simples	Catecol, hidroquinona, resorcinol
	Benzoquinonas	2,6-dimetoxibenzoquinona
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido salicílico
C ₆ -C ₂	Acetofenonas	3-Acetil-6-metoxibenzaldehído
	Ácidos fenilacéticos	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
C ₆ -C ₃	Ácidos cinámicos	Ácido cafeico, ácido ferúlico
	Fenilpropenos	Eugenol, miristicina
	Cumarinas	Umbeliferona, esculetina, escopoletina
	Isocumarina	Bergenina
	Cromonas	Eugenina
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Juglona
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Mangostina, mangiferina
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Resveratrol
	Antraquinonas	Emodina
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	
	<i>Flavonas</i>	Sinensetina, nobiletina, tangeretina, diosmina
	<i>Flavonoles</i>	Quercetina, miricetina, kampferol
	<i>Glicósidos de flavonol</i>	Rutina
	<i>Flavononoles</i>	Glicósidos de dihidroquercetina, dihidrokampferol
	<i>Flavanonas</i>	Hesperitina, naringenina
	<i>Glicósidos de flavanona</i>	Hesperidina, neohesperidina, narirutina, naringina
	<i>Antocianinas</i>	Glicósidos de cianidina, pelargonidina, malvidina
	<i>Flavanoles (catequinas)</i>	(+)-Catequina, (-)-Epicatequina, (+)-galocatequina
	<i>Chalconas</i>	Genisteína
	Isoflavonoides	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos	Pinoresinol
	Neolignanos	Eusiderina
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Agatisflavona
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas	
(C ₆) ₆	Catecol melaninas	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Flavolanos	(Taninos condensados)

La condensación de tres residuos C₂ con un ácido hidroxicinámico activo produce dos clases de metabolitos con un segundo anillo aromático vinculado a la fracción fenilpropanoide, los estilbenos (C₆-C₂-C₆) y los flavonoides (C₆-C₃-C₆). La estructura

química básica de los flavonoides es el núcleo flavano, compuesto por 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos: dos anillos de benceno en combinación con un anillo pirano, que contiene oxígeno (Figura 1.3). En función del grado de insaturación y del grado de oxidación de la cadena central de tres átomos de carbono se pueden diferenciar los diferentes tipos de flavonoides. A su vez, dentro de éstos, se pueden distinguir diferentes clases en función del número y la naturaleza de los grupos sustituyentes unidos a los anillos.

Así pues, teniendo en cuenta estas consideraciones y ampliándolas a los demás subgrupos de compuestos fenólicos, no resulta difícil comprender la ingente cantidad de estructuras posibles, máxime si se piensa que, además, muchos de estos compuestos pueden sufrir reacciones de condensación para dar lugar a oligómeros o polímeros, tales como lignanos, ligninas, proantocianidinas, etc. (Figura 1.3, Tabla 1.2).

La química de los compuestos fenólicos se ve complicada aun más por el hecho de que la mayoría de estos compuestos se presentan en la Naturaleza en forma conjugada, principalmente con una o varias moléculas de azúcar unidas a través de los grupos hidroxilo. Los monosacáridos normalmente asociados son glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, manosa, apiosa, alosa, y los ácidos glucurónico y galacturónico. Además, estos azúcares pueden presentarse como di-, tri- o tetrasacáridos. Otras formas conjugadas incluyen uniones con ácidos orgánicos (alifáticos y aromáticos) e inorgánicos, aminas, lípidos e incluso con otros fenoles, lo que añade mayor complejidad a la hora de caracterizar químicamente estos compuestos (Harborne y Williams, 2000).

Dentro de una misma planta los compuestos fenólicos se encuentran presentes en, prácticamente, todas las partes de la misma. Sin embargo, la distribución de estos compuestos no suele ser uniforme ni desde un punto de vista cualitativo ni cuantitativo (Tabla 1.3). Así, por ejemplo, los frutos son especialmente ricos en ácidos cinámicos (Haminiuk et al., 2012), que normalmente se presentan formando ésteres con ácido quínico, glucosa o ácido tartárico. Por su parte, los flavanoles (que algunos autores denominan genéricamente catequinas) en sus formas mono-, oligo- o poliméricas,

aunque también son importantes constituyentes de los frutos (donde se encuentran, principalmente, en forma libre, no glicosilados), son los compuestos fenólicos mayoritarios de la madera y, sobre todo, de la corteza de determinados árboles, de donde se extraían (y se extraen) con fines industriales (Tabla 1.3) (Matthews et al., 1997).

Tampoco suele existir homogeneidad en cuanto a la distribución de los compuestos fenólicos dentro de un órgano, ya que los diferentes tejidos que lo forman no presentan la misma capacidad biosintética. De nuevo, en el caso de los frutos, la acumulación de fenoles solubles es mayor en los tejidos externos (epidermis y capa subepidérmica) que en los internos (mesocarpo y pulpa) (Haminiuk et al., 2012). A veces la situación se hace más compleja, como en el caso de las antocianinas que, en las capas internas de la piel, se encuentran mayoritariamente en su forma de base quinonoidal y en las capas externas en la forma de catión flavilio, diferencia debida al diferente pH de las vacuolas en ambas zonas del tejido.

Tabla 1.3. Concentración relativa de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales (Pratt y Hudson, 1990).

Tejido	Concentración relativa
Fruto	Ácidos cinámicos > catequinas \approx leucoantocianinas (flavan-3,4-dioles) > flavonoles
Hoja	Flavonoles \approx ácidos cinámicos > catequinas \approx leucoantocianinas
Madera	Catequinas \approx leucoantocianinas > flavonoles > ácidos cinámicos
Corteza	Igual que en la madera, pero mayores concentraciones

A nivel subcelular, los compuestos fenólicos se acumulan en forma soluble principalmente en las vacuolas con relativamente pequeñas cantidades en el espacio libre apoplástico, estando, debido a su alta reactividad, ausentes del citoplasma. Sin embargo, estos compuestos también pueden presentarse ligados a determinadas estructuras subcelulares, como es el caso de la pared celular, donde se acumulan las ligninas y algunas moléculas simples, derivadas de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (Robards et al., 1999). La presencia de compuestos fenólicos en diferentes

estados (solubles, en suspensión o ligados a los componentes de la pared celular) afecta a su extracción y, por lo tanto, a la cuantificación de los mismos (Winkel-Shirley, 2002).

Finalmente, la síntesis y la acumulación de los compuestos fenólicos están condicionadas por el estado de desarrollo general de la planta o de los órganos, tejidos y células considerados. El control de estos procesos, que determinan en última instancia la distribución de estos metabolitos secundarios, viene determinado, a su vez, por factores de tipo endógeno relacionados con los procesos de diferenciación dependientes del desarrollo y/o por factores externos tales como la luz, la temperatura o los ataques de agentes bióticos o abióticos (Winkel-Shirley, 2002; Hichri et al., 2011; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

II.1.1. 1. Compuestos fenólicos en tomate

La composición de metabolitos en los frutos de tomate depende de varios factores, como tipo de tejido (Moco et al., 2007; Peng et al., 2008), el estado fisiológico y nutricional de la planta (Parr y Bolwell, 2000; van der Rest et al., 2006; Gómez et al., 2009), tipo de cultivar (Stewart et al., 2001), condiciones climáticas (Dumas et al., 2003, Gautier et al., 2008), prácticas culturales (Mitchell et al., 2007) y condiciones de almacenamiento de los frutos (Slimestad y Verheul, 2009; Gómez et al., 2009), entre otros.

En frutos de tomate, con excepción de algunos genotipos (Willits et al., 2005), los flavonoides y sus formas glicosiladas se localizan principalmente en el exocarpo (Muir et al., 2001; Bovy et al., 2002; Moco et al., 2006a y b y 2007; Slimestad y Verheul, 2009), mientras que en el resto de los tejidos del pericarpo apenas se acumulan flavonoides. Estos datos bioquímicos se correlacionan con la expresión de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los flavonoides en los tejidos del fruto, así, en el mesocarpo y endocarpo sólo se detectan pequeños niveles de transcritos de estos genes, mientras que en el exocarpo se detectan niveles significativos de chalcona sintasa (CHS), flavonona-3'-hidroxilasa (F3'H) y flavonol sintasa (FLS) (Colliver et al., 2002; Bovy et al., 2007). Los principales flavonoides en los frutos de tomate son la

naringenina chalcona, la rutina y el kampferol (Hunt y Baker, 1980; Verhoeyen et al., 2002; Bovy et al., 2007).

Mediante estudios metabolómicos, basados en HPLC-DAD-ESI-MS, se ha comprobado que, además de estos flavonoles, en los frutos de tomate de tres cultivares (Raf, Rambo y Daniela) se detectaron altos niveles de ácidos hidroxicinámicos y derivados (como cafeoil-hexosa I, ácido cumárico hexosa I y ácido clorogénico) y ácidos fenilacéticos y derivados (como el ácido homovainílico hexosa I y II) (Gómez-Romero et al., 2010).

También se ha puesto de manifiesto que durante la maduración del fruto de tomate los flavonoides se encuentran principalmente en la epidermis y que su patrón de acumulación durante el desarrollo puede definirse por diferentes tipos de flavonoides. Así, mientras que la naringenina y la naringenina chalcona aumentan con el desarrollo del fruto, los niveles de quercetín-trisacárido disminuyen (Moco et al., 2007; Iijima et al., 2008a y b).

En el cultivar MT, usando LC-FT-ICR-MS, se ha descrito la presencia de 869 metabolitos y, de éstos, 70 eran flavonoides, de los que se identificaron, mediante MS/MS, cuatro chalconas y agliconas de flavanonas (naringenina chalcona, naringenina, eriodictiol y eriodictiol chalcona), y dos agliconas de flavonol (quercetina y kampferol) (Iijima et al., 2008a y b). En la epidermis de MT también se ha descrito la presencia de un estilbenoide, el resveratrol, detectado por GC-MS y con unos niveles de 18,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco (Ragab et al., 2006).

II.1.2. Biosíntesis de los compuestos fenólicos

Como se ha comentado en el apartado anterior, los fenilpropanoides se originan a partir de los aminoácidos L-fenilalanina (Phe) y L-tirosina (Tyr) (Figura 1.3). La ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides (Figura 1.4) se inicia por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.5), que cataliza la desaminación no oxidativa de Phe, dando lugar a amonio y al ácido *trans*-cinámico (Dixon y Paiva, 1995). En dicotiledóneas la enzima PAL es capaz de desaminar de forma eficiente Phe, mientras que la PAL de algunas monocotiledóneas, como el maíz, puede desaminar tanto a Phe

como a Tyr. Esta enzima fue descrita por primera vez por Koukol y Conn (1961) y, desde entonces, ha sido objeto de un gran número de investigaciones, muchas de las cuales hacen hincapié en la correlación entre la expresión de esta enzima y los niveles de compuestos fenólicos (Boudet, 2007, y referencias en el artículo). No obstante, además de esta regulación *de novo*, se han descrito otros mecanismos de regulación para la PAL mediante *feed-back* (Blount et al., 2000) y modificaciones postranscripcionales (Cheng et al., 2001).

La PAL también forma complejos enzimáticos responsables de la canalización específica de sustratos o *channeling*. Fue Stafford (1974) quién sugirió que las enzimas que catalizan reacciones secuenciales de la ruta de los fenilpropanoides estaban organizadas en complejos, conocidos como compartimentos metabólicos o *metabolones*, en los que el producto de la enzima formado en una reacción catalítica se transfiere de forma directa a otra enzima sin ser liberado al citoplasma. Este proceso de canalización puede llevarse a cabo mediante interacciones físicas entre las distintas enzimas, como se ha demostrado en la ruta de biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana* (Winkel-Shirley, 1999) y/o puede llevarse a cabo mediante co-localizaciones de las enzimas sobre membranas u otras superficies (Liu y Dixon, 2001).

Se han presentado gran número de evidencias que sugieren la canalización de ácido *trans*-cinámico entre la PAL y la cinamato hidroxilasa (C4H) *in vivo* para producir el ácido hidroxicinámico *p*-cumárico, un intermediario clave de la ruta de los fenilpropanoides (Rasmussen y Dixon, 1999). Achnine et al. (2004) usando plantas transgénicas de tabaco que expresan dos isoformas de PAL de tabaco (PAL1 y PAL2) y de C4H han observado que la localización subcelular de las isoformas de PAL es diferente y que ésta depende de la cantidad de C4H capaz de formar complejos con PAL1. La C4H es una citocromo P450 asociada al retículo endoplásmico (RE) y ancla sólo a la PAL1 al RE. El ácido *trans*-cinámico producido por la isoforma PAL2 llegaría a la enzima C4H mediante difusión por el citoplasma (Achnine et al., 2004). Esta distribución subcelular diferencial del ácido *trans*-cinámico (RE y citosol), debido a la diferente localización de las isoformas PAL1 y PAL2, podría ayudar a canalizar la biosíntesis de fenilpropanoides entre las diferentes rutas, incluyendo aquellas que evitan

la catalizada por C4H (por ejemplo, la 2-hidroxilación del ácido cinámico).

Se conocen varios inhibidores de la PAL, como el ácido 2-amino-4-bromoindano-2-fosfórico, que es un potente inhibidor sintético (Miziak et al., 2007), y el cinamaldehído (Fujita et al., 2006) que, curiosamente, impide el pardeamiento en hojas de lechuga cortada.

Las citocromo P450 monoxigenasas son otro grupo de enzimas implicadas en el metabolismo de los fenilpropanoides. La mayoría de los fenoles que proceden de la Phe son oxidados a 4-cumaroil-CoA. La enzima 4-cumarato:CoA ligasa (4CL; EC 6.2.1.12) cataliza la formación de este intermediario activado que se emplea en la biosíntesis de distintos tipos de fenilpropanoides, como monolignoles, flavonoides, cumarinas, estilbenos, xantonas, ésteres fenólicos, derivados benzoicos, etc. (Dixon y Paiva, 1995; Boudet, 2007; Vogt, 2010).

Se han identificado más de dieciséis citocromo P450 monoxigenasas implicadas en todas estas rutas. En 1993 se aislaron cADNs que codificaban C4H en diferentes especies de plantas y se denominaron CYP73, basándose en la nomenclatura de estas enzimas (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Estas enzimas contienen la típica señal de localización del RE y son altamente específicas en la conversión de cinamato (Boudet, 2007). La reducción de los niveles de C4H en plantas transgénicas induce efectos pleiotrópicos en el patrón de fenoles, incluyendo una reducción en los niveles de ácido clorogénico, flavonoides y ligninas (Boudet, 2007).

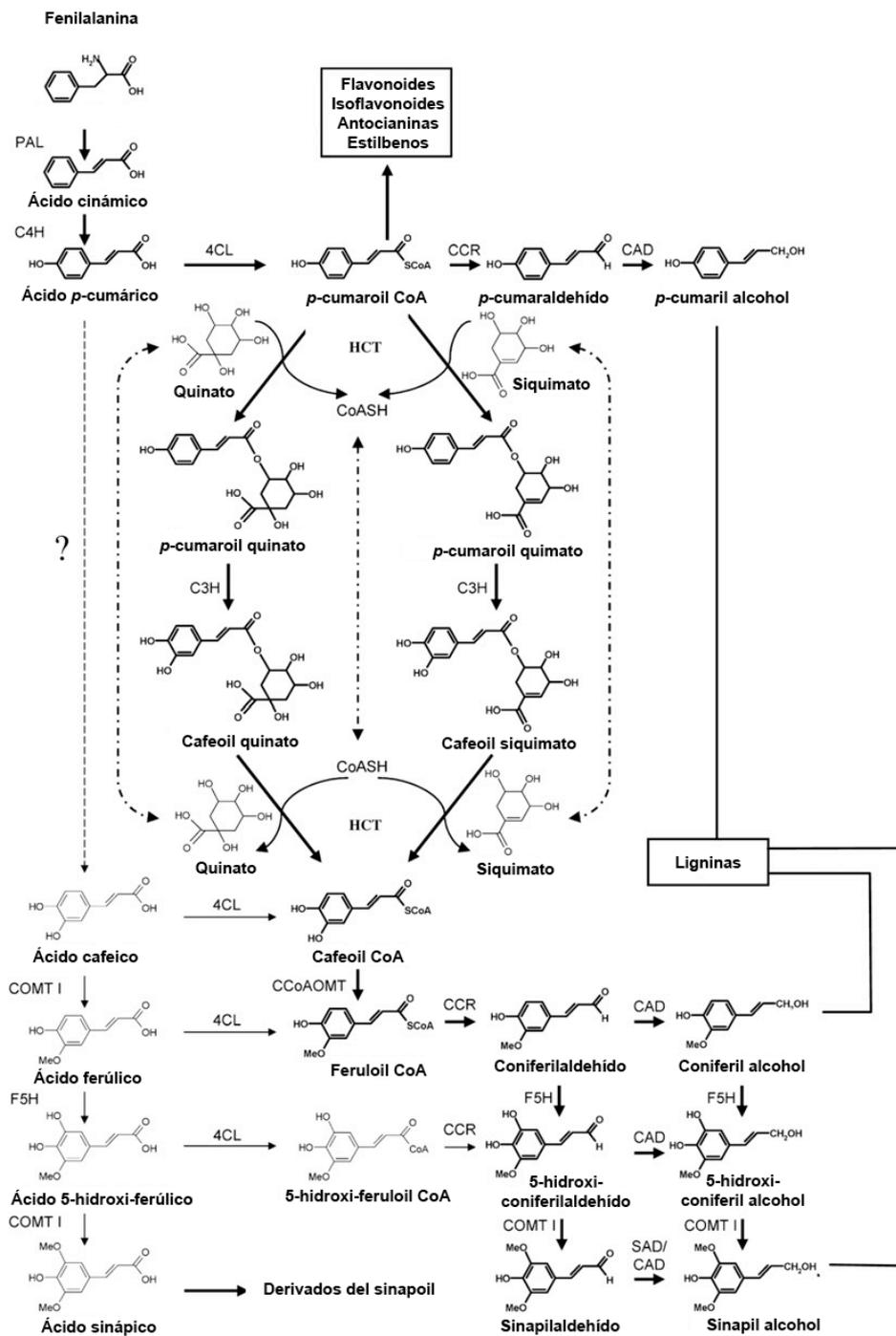


Figura 1.4. Ruta de biosíntesis simplificada de los fenilpropanoides. 4CL, 4-hidroxicinamoil-CoA ligasa; C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; CAD, cinamil-alcohol deshidrogenasa; CCoAOMT, cafeoil-CoA *O*-metiltransferasa; CCR, cinamoil-CoA reductasa, COMT I, ácido cafeico/5-hidroxiferúlico *O*-metiltransferasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa; HCT, hidroxicinamoiltransferasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; SAD, sinapil-alcohol deshidrogenasa. Adaptado de Boudet (2007).

En la última década se ha identificado la enzima responsable de la hidroxilación en la posición 3 de los intermediarios fenólicos (formación de ácido cafeico a partir de *p*-cumárico). Esta enzima es una CYP98 y es la principal 3-hidroxilasa (*meta*-hidroxilasa) en el metabolismo de los fenilpropanoides (Boudet, 2007). Franke et al. (2002) demostraron que esta enzima actúa como una 5-*O*-(4-cumaroil) siquimato/quinato-3'-hidroxilasa (C3'H). Otra enzima importante es la denominada hidroxicinamoil-CoA: siquimato/quinato hidroxicinamoil transferasa. Esta acetiltransferasa cataliza la síntesis de los ésteres de siquimato y de quinato cumaroil, los sustratos de las CYP98s, y también lleva a cabo la formación reversible de cafeoil-CoA a partir de 5-*O*-cafeoil siquimato éster, que corresponde a una etapa de la biosíntesis de ligninas (Hoffmann et al., 2003). Otras transferasas específicas (hidroxicinamoil-CoA quinato: hidroxicinamoil transferasa) podrían contribuir a la formación de ácido clorogénico en diversas especies acumuladoras, como el tomate (Niggeweg et al., 2004).

Las ferulato-5-hidroxilasas son las responsables de las hidroxilaciones en la posición 5 de los fenilpropanoides y se engloban en la familia CYP84 de las citocromo P450 monoxigenasas (Meyer et al., 1996). Recientemente se ha comprobado que las hidroxilaciones en C5 ocurren predominantemente, si no de forma exclusiva, en el coniferilaldehído y en el alcohol coniferílico, pero no, como se había asumido, en el ácido libre. Por tanto, esta enzima se ha denominado coniferilaldehído 5-hidroxilasa (CA5H) (Boudet, 2007). Numerosos estudios genéticos han puesto de manifiesto que esta enzima desempeña un papel clave en la regulación del flujo hacia la fracción siringilo de las ligninas (Boudet, 2007, y referencias en el artículo).

Además de estos tres tipos principales de hidroxilaciones de la ruta fenilpropanoide comunes a todas las plantas vasculares, las P450 están implicadas en un gran número de reacciones como las relacionadas con la síntesis de ácido salicílico y de derivados benzoicos o la hidroxilación del anillo B de los flavonoides (Boudet, 2007, y referencias en el artículo). Por tanto, no es de extrañar que estas citocromo P450 oxidasas se consideren como las principales responsables de la diversidad y de la flexibilidad del metabolismo de los fenilpropanoides y son, además, claves en el control del flujo hacia las distintas rutas de síntesis de los fenilpropanoides.

Estudios genómicos realizados con plantas pertenecientes a taxones diversos han puesto de manifiesto que las enzimas que participan en las rutas principales del metabolismo fenilpropanoide están codificadas por familias multigénicas. Así, por ejemplo, la familia multigénica de la PAL consta de cuatro genes en *Arabidopsis*, cinco en *Populus trichocarpa* y nueve en arroz (Hamberger et al., 2007). Cada uno de estos genes responden de forma diferente al estrés biótico y abiótico y su patrón de expresión es temporal y está controlado por el desarrollo (Vogt, 2010, y referencias en el artículo). Por el contrario en tomate y en otras solanáceas se han identificado 20 genes putativos que codifican PAL (Chang et al., 2008; Vogt, 2010, y referencias en el artículo), aunque sólo uno de estos genes se expresa en todos los tejidos, mientras que el resto parecen estar silenciados. Esta infrautilización génica es bastante peculiar y los mecanismos genéticos implicados en este extenso silenciamiento génico todavía no se han elucidado (Chang et al., 2008).

En relación con la 4-cumarato:CoA ligasa (4CL) se han identificado cuatro genes en *Arabidopsis thaliana*, *At4CL1*, *At4CL2*, *At4CL3* y *At4CL4*. Estos genes codifican enzimas con diferentes preferencias y especificidades, en función del sustrato. Además, se ha sugerido que *At4CL3* participa en la biosíntesis de flavonoides, mientras que *At4CL1* y *At4CL2* estarían implicadas en la formación de ligninas (Boudet, 2007, y referencias en el artículo). Por tanto, se pone de manifiesto la importancia de esta familia multigénica en el control de las distintas rutas de síntesis de fenilpropanoides.

La estilbeno sintasa (STS) y la chalcona sintasa (CHS) son enzimas homodiméricas muy relacionadas (sus secuencias aminoacídicas son idénticas en > 60 %) que catalizan la condensación secuencial de tres unidades de acetato y una molécula de *p*-cumaroil-CoA (Tropf et al., 1995). La reacción típica de la STS incluye, además, una etapa de descarboxilación, que no la lleva a cabo la CHS. Así, dependiendo de la policétido sintasa empleada se obtienen estilbenos o chalconas, siendo estas últimas las precursoras de flavonoides (Tropf et al., 1995). La chalcona formada puede ser convertida en diversos tipos de flavonoides, como flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y antocianinas por diversas enzimas como flavanona 3-hidroxilasa (F3'H), isoflavona sintasa (IFS), flavona sintasa (FS), flavonol sintasa (FLS), dihidroxiflavonol

reductasa (DFHR) y antocianina sintasa (ANS) (Fig. 1.5; Dixon y Paiva, 1995; Winkel-Shirley, 2002).

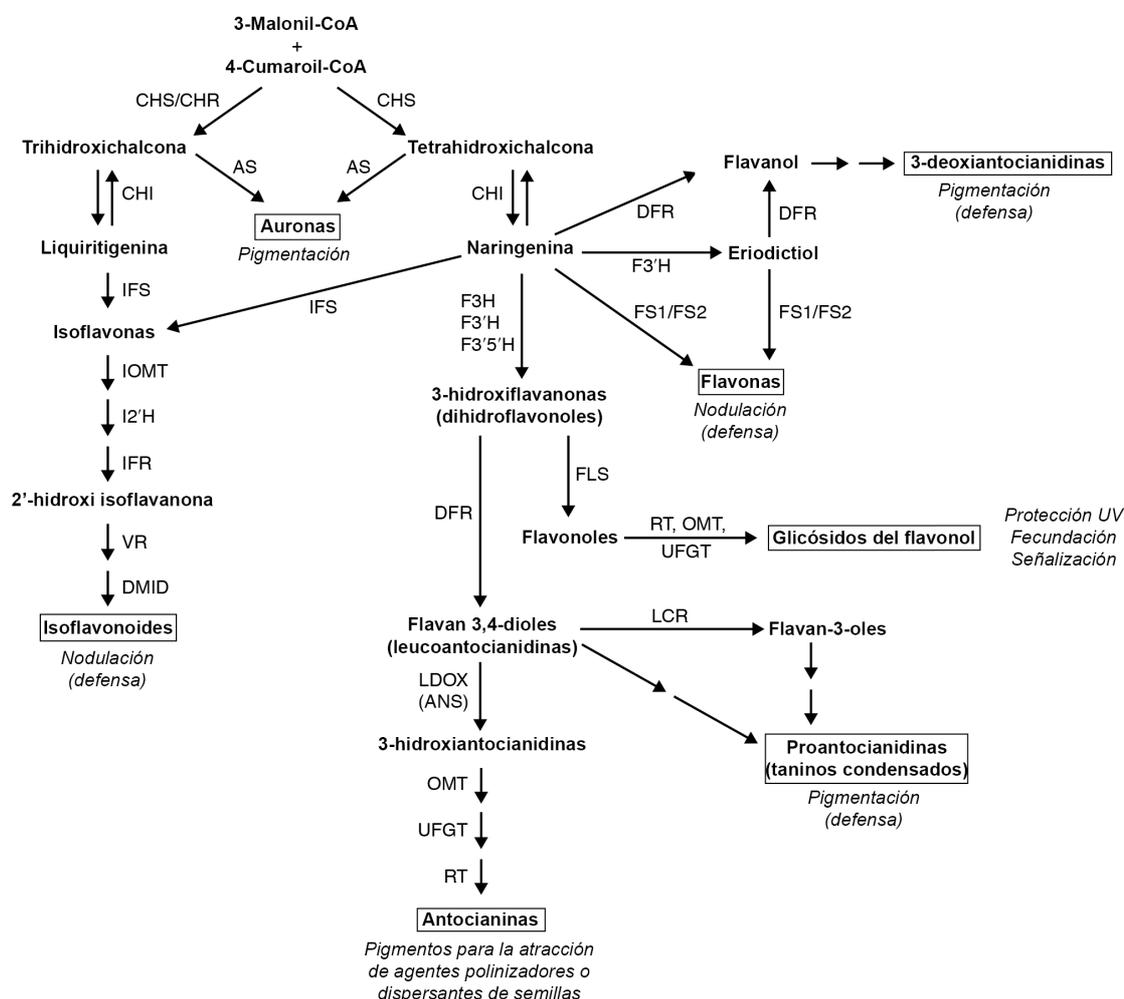


Figura 1.5. Ruta de biosíntesis de los flavonoides. ANS, antocianidín sintasa; AS, aureusidín sintasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; CHR, chalcona reductasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; DMID, 7,2'-dihidroxi-4'-metoxisoflavanol deshidratasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa; FSI/FS2, flavona sintasa; IOMT, isoflavona *O*-metiltransferasa; LCR, leucoantocianidín reductasa; LDOX, leucoantocianidín dioxigenasa; OMT, *O*-metiltransferasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; RT, ramosil transferasa; UFGT, UDP-flavonoide glucosiltransferasa; VR, vestitona reductasa. Los principales tipos de flavonoides aparecen recuadrados. Alguna de las funciones de cada compuesto se muestran en *italica*. Adaptado de Winkel-Shirley (2002).

A diferencia de los flavonoides, los compuestos de naturaleza estilbenoide se han identificado en varias familias filogenéticamente poco relacionadas como Pinaceae (coníferas), Myrtaceae, Fagaceae, Fabaceae, Moraceae, Vitaceae (dicotiledóneas), Araceae y Liliaceae (monocotiledóneas).

II.1.3. Funciones fisiológicas de los compuestos fenólicos

Una de las funciones probadas de los compuestos fenólicos en las células vegetales consiste en aumentar la rigidez de la pared celular a través de la formación de lignina o actuando como puentes moleculares entre los diferentes componentes de la pared (Weng y Chapple, 2010). En este último proceso están implicados los ácidos hidroxicinámicos, que se encuentran presentes en cantidades significativas en las paredes celulares. Estos compuestos se unen a los polisacáridos de la pared, tales como arabinoxilanos, xiloglucanos y pectinas, a través de enlaces de tipo éster. El posterior entrecruzamiento, por enlaces de tipo éter, entre los residuos fenólicos conduce a la dimerización de los hidroxicinamatos y a la unión de dos cadenas de polisacáridos, y ligninas o, incluso, de polisacáridos y proteínas (Popper, 2008).

Las consecuencias que se derivan de este hecho son muy importantes para el desarrollo, ya que el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular modifica las propiedades mecánicas de la misma, reduciendo su extensibilidad (Wakabayashi et al., 1997) y conduciendo al cese del crecimiento (Kamisaka et al., 1990). Además, los hidroxicinamatos localizados en la pared y sus dímeros podrían actuar como lugares de iniciación de la lignificación (Ralph et al., 1992), o estar implicados en la adhesión intercelular (Waldron et al., 1996).

Aparte de en reacciones que conducen al cese del crecimiento, los compuestos fenólicos han sido implicados en la regulación de la división y de la expansión celular. Así, se ha comprobado que tres enantiómeros (A, B y E) del glucósido del alcohol deshidrodiconiferílico muestran actividad promotora del crecimiento en tabaco (Binns et al., 1987). Estos isómeros están presentes tanto en tejidos en reposo como en aquellos que muestran un crecimiento activo estimulado por citoquininas. Sin embargo, en estos últimos

tejidos la concentración de los glucósidos es dos órdenes de magnitud superior a la de los tejidos quiescentes, lo cual sugiere que los reguladores del crecimiento pueden estimular la acumulación o disponibilidad de estos compuestos fenólicos, los cuales, a su vez, promoverían el crecimiento celular. Así, los glucósidos del alcohol deshidrodiconiferílico participarían como mediadores del crecimiento inducido por citoquininas (Teutonico et al., 1991).

Otra función atribuida a los compuestos fenólicos en el ámbito de su participación en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal radica en su capacidad de modulación de la oxidación enzimática del ácido indol-3-acético (AIA). Así, en términos generales, se ha establecido que mientras que los compuestos monofenólicos estimulan la oxidación de esta fitohormona, los polifenoles (tradicionalmente denominados "protectores auxínicos"; Stonier, 1972) inhiben a la enzima responsable de esta degradación. Más recientemente se ha podido determinar que existe una concentración umbral a partir de la cual los compuestos fenólicos muestran su efecto activador o inhibidor y que algunos monofenoles, como los ácidos ferúlico y sinápico, pueden mostrar un efecto inhibidor de la oxidación enzimática del AIA a concentraciones relativamente bajas (Volpert et al., 1995). Entre los mecanismos a través de los cuales los compuestos fenólicos podrían modular la degradación del AIA se incluyen una interacción directa con la enzima, con lo cual se produciría una competición entre la fitohormona y el fenol por el centro activo de la misma (García-Florenciano et al., 1991; Volpert et al., 1995), y un papel como agentes antioxidantes, a través de la desactivación de los radicales libres formados durante la reacción enzimática (Krylov et al., 1994).

El carácter antioxidante de los compuestos fenólicos es, precisamente, la base de otra de sus funciones. Así, los derivados de hidroxicinamatos y los flavonoides han sido implicados en la protección frente a la peroxidación de los lípidos, constituyentes de las estructuras membranosas celulares, proceso que conllevaría la rotura de membranas y la pérdida de compartimentación, y, por tanto la funcionalidad, de la célula (Rice-Evans et al., 1997). En este sentido, se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían participar, en conjunción con el ácido ascórbico y, posiblemente, otros reductores, junto con la

enzima peroxidasa, en un sistema encargado de regular el estado redox de la célula (Takahama, 1998).

Los compuestos fenólicos también desempeñan funciones de tipo ecológico, como la atracción de agentes polinizadores o dispersantes de semillas. Además, intervienen en el establecimiento de interacciones de tipo simbiótico, como en el proceso de micorrización (Weiss et al., 1999), o activando los genes de *Rhizobium* necesarios para la formación de los nódulos en los que se produce la fijación del nitrógeno atmosférico (Long, 1989). Sin embargo, los procesos en los que más se ha estudiado el papel de los fenoles son, sin lugar a dudas, aquellos relacionados con la protección de la planta ante situaciones de estrés. Así, protegen frente al exceso de radiación UV (Svobodova et al., 2003), evitan la depredación aumentando la astringencia de los órganos donde se acumulan (Appel, 1993) y participan en la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos a través de diferentes mecanismos (reforzamiento de las paredes celulares, efecto biocida, etc.) (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Muchas de las funciones mencionadas vienen mediadas por la actuación de enzimas oxidativas (peroxidasas y fenoloxidasas) sobre los compuestos fenólicos. Las enzimas oxidativas estudiadas en esta memoria fueron las peroxidasas, por lo que a continuación se describen, brevemente, algunas de sus características más relevantes.

II.1.4. Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7; donador de hidrógeno: H₂O₂ oxidorreductasas) son enzimas que contienen un grupo hemo como grupo prostético, protohemina IX, dos iones Ca²⁺ estructurales, y, en su estado nativo, un átomo de Fe en el estado de oxidación +3 (Passardi et al., 2005; Almagro et al., 2009). En su ciclo normal peroxidativo catalizan la oxidación de un gran número de compuestos, sobre todo compuestos fenólicos, a expensas de H₂O₂ en dos pasos consecutivos monoelectrónicos. En su ciclo hidroxílico, las peroxidasas pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Passardi et al., 2005) y, por tanto, al regular los niveles de ROS afectan a la homeostasis redox celular y a los procesos de señalización (Foyer y Noctor, 2009).

Las peroxidases vegetales de secreción son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 40 y 45 kDa. La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %; los principales glúcidos a los que se une son N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y xilosa, siendo la manosa, frecuentemente, la mayoritaria. La glicosilación es uno de los principales factores responsables de la gran estabilidad térmica de las peroxidases vegetales de secreción (Passardi et al., 2005; Almagro et al., 2009). Las peroxidases pertenecen a una amplia familia multigénica que incluye 138 miembros en arroz (Passardi et al., 2004a) y 73 miembros en el genoma de *Arabidopsis* (Welinder et al., 2002). Son enzimas, por tanto, altamente polimórficas, si bien algunas de estas isoenzimas pueden originarse por modificaciones post-transcripcionales resultantes de diferentes patrones de glicosilación. Este polimorfismo puede ser fácilmente estudiado mediante isoelectroenfoque y, de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de peroxidasa se clasifican como ácidas ($pI < 7,0$), moderadamente básicas ($7,0 < pI < 9,0$) o fuertemente básicas ($pI > 9,0$). Por otra parte, el polimorfismo y heterogeneidad de la enzima puede provenir de interacciones conformacionales entre las isoenzimas de peroxidasa y los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló et al., 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz, 1989), ampliando así su papel metabólico.

Las peroxidases se encuentran localizadas tanto en las paredes celulares como en las vacuolas, bien en forma soluble o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló et al., 1991 y 1998). Esta distinta compartimentalización celular incluye a las distintas isoenzimas de la peroxidasa. Así, mientras que el espectro completo de peroxidases (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, las fuertemente básicas solamente se encuentran localizadas en las vacuolas (Ros Barceló et al., 1998). Esta localización vacuolar frente a la localización en la pared celular de las isoenzimas de peroxidasa está de acuerdo con la mayoría de sus funciones fisiológicas aceptadas: la biosíntesis de ligninas (polimerización de los alcoholes cinamílicos) y el entrecruzamiento de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas, procesos que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal, y la biosíntesis y recambio de metabolitos secundarios, como alcaloides y fenoles, que se compartimentalizan

principalmente en la vacuola. En este sentido, está ampliamente recogido en la bibliografía que las peroxidasa son capaces de oxidar fenoles como ácidos benzoicos, DOPA, cumarinas, estilbenos, catequinas, chalconas, flavonoles, isoflavonas, alcoholes cinámicos, ácidos cinámicos y antocianinas.

Desde los trabajos pioneros de Takahama y Egashira (1990) sobre la participación de la peroxidasa en la biosíntesis y degradación oxidativa de sustratos vacuolares, se considera que ésta es una de sus funciones más importantes. Diferentes estudios sugieren la participación de la peroxidasa en el recambio y degradación de fenoles vacuolares y que este sistema peroxidasa/fenol podría estar implicado en la regulación precisa de los niveles de H₂O₂ (Takahama, 1998; Ferreres et al., 2011; López-Orenes et al., 2013).

II.2. Terpenoides o isoprenoides

II.2.1. Generalidades

Los terpenoides o isoprenoides son compuestos ampliamente distribuidos en plantas, así como en microorganismos y en animales. Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios y se han descrito más de 50000 miembros individuales (Morrone et al., 2011). Los terpenoides son esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas; ejemplo de ello lo constituyen las hormonas (ácido abscísico, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides), los pigmentos fotosintéticos (constituyente de la estructura de la clorofila, fitol y carotenoides), los transportadores de electrones (ubiquinona) o los fitosteroles que forman parte de las membranas celulares (Enfissi et al., 2005; Falara et al., 2011; James et al., 2013). Además, muchos de ellos están implicados en relaciones ecológicas y/o intervienen en respuestas a estreses bióticos y abióticos (Akram et al., 2008; Bleeker et al., 2011). Muchos de estos compuestos terpenoides presentan actividad biológica y son, por tanto, de interés para la industria agroalimentaria y farmacológica (Ashour et al., 2010).

II.2.1.1. Compuestos terpenoides en tomate

En tomate los terpenos se encuentran en grandes cantidades en el tricoma de las hojas, tallos, frutos jóvenes y, en parte, en flores (Bleeker et al., 2011). Los triterpenoides, se han estudiado ampliamente en la cutícula de los frutos de tomate (Wang et al., 2011; Szakiel et al., 2012 y referencias en el artículo) y se han encontrado diferentes terpenoides como α , β y δ -amirina, taraxerol, taraxasterol, γ -taraxasterol, ψ -taraxasterol, lupeol, lanasterol, germanicol, cicloartenol, colesterol, estigmasterol y β -sistosterol (Bauer et al., 2004a y b; Leide et al., 2007).

II.2.2. Ruta biosintética de los terpenoides en plantas

Los terpenoides no sólo son muy numerosos, sino que, además, presentan una gran variabilidad en cuanto a estructura, ya que existen cientos de esqueletos carbonados diferentes con una amplia variedad de grupos funcionales (Gershenzon y Engelbert, 2010). A pesar de su diversidad, el precursor común de todos los terpenoides es la molécula de 5 átomos de carbono (C5) isopentenilpirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP), también denominadas unidades de isopreno (Dubey et al., 2003). Estos dos compuestos dan origen a todos los terpenos naturales (McGarvey y Croteau, 1995; Dubey et al. 2003; Taiz y Zeiger, 2010). Los terpenos se clasifican en base al número de unidades de isopreno presentes en su estructura (Tabla 1.4).

La ruta biosintética de los terpenoides en plantas ha sido ampliamente estudiada (Rodríguez-Concepción, 2006; Hemmerlin et al., 2012; Vranová et al., 2013) y se pueden originar por dos vías, la ruta clásica o ruta del ácido mevalónico (ruta MVA), que tiene lugar en el citosol/RE (McGarvey y Croteau, 1995; Figura 1.6), y es mayoritariamente responsable de la generación de los sesquiterpenos y esteroides, y la ruta del metileritritol-4-fosfato (ruta MEP), localizada en los plastos (Eisenreich et al., 2001; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Figura 1.6) y que da lugar a los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos a partir de las unidades de isopreno, IPP y DMAPP, generadas por ambas rutas. Así, en los siguientes pasos de la ruta, IPP y DMAPP se condensan para generar geranilpirofosfato (GPP, C10), farnesilpirofosfato (FPP, C15) y geranilgeranilpirofosfato (GGPP, C20). A continuación, los compuestos

C10-C20, tras una serie de reacciones de ciclación y reordenamiento, generan los esqueletos carbonados que darán lugar a cada clase de terpenos. De esta manera, GPP, FPP y GGPP son convertidos en mono- sesqui- y diterpenos, respectivamente, y, a su vez, FPP y GGPP pueden dimerizarse para dar lugar a los precursores C30 y C40, respectivamente. Finalmente, tienen lugar una serie de reacciones de oxidación, isomerización, conjugación y otras transformaciones mediante las cuales cada clase de terpenos será convertida en cientos de metabolitos terpenoides diferentes (Gershenzon y Engelbert, 2010).

Tabla 1. 4. Clasificación de los terpenoides y algunos ejemplos presentes en plantas.

Unidades de isopreno	Tipo de terpenoide	Especie de planta	Referencia
1	Hemiterpeno (Isopreno)	<i>Populus nigra</i>	Dubey et al. (2003)
2	Monoterpeno (Geraniol)	<i>P. graveolens</i>	Eisenreich et al. (1997)
3	Sesquiterpenos (Capsidiol)	<i>N. tabacum</i>	Perrone et al. (2003)
4	Diterpenos (Taxol)	<i>T. chinensis</i>	Wang et al. (2001)
6	Triterpenos (Taraxasterol)	<i>S. lycopersicum</i> cv MT	Leide et al. (2007)
8	Tetraterpenos (Licopeno)	<i>S. lycopersicum</i>	Martínez-Valverde et al. (2002)
9-3000	Politerpenos (Caucho)	<i>Hevea brasiliensis</i>	Dusotoit-Coucaud et al. (2009)

II.2.2.1. Ruta del ácido mevalónico (MVA)

La síntesis de IPP a través de la ruta MVA se inicia con la condensación de tres unidades de acetil-coenzima A (acetil CoA) mediante la acción secuencial de dos enzimas, la acetoacetil-CoA tiolasa y la 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA sintasa (HMGS) (Figura 1.6). El producto resultante de 6C, (S)-HMG CoA, es convertido en MVA a través de dos pasos de reducción que requieren NADPH por acción de la enzima HMG CoA reductasa (HMGR). A continuación, el MVA experimenta dos

fosforilaciones consecutivas para transformarse en IPP. Este IPP, por acción de la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI), es convertido en su isómero DMAPP por desplazamiento del doble enlace de la posición 3-4 a la 2-3.

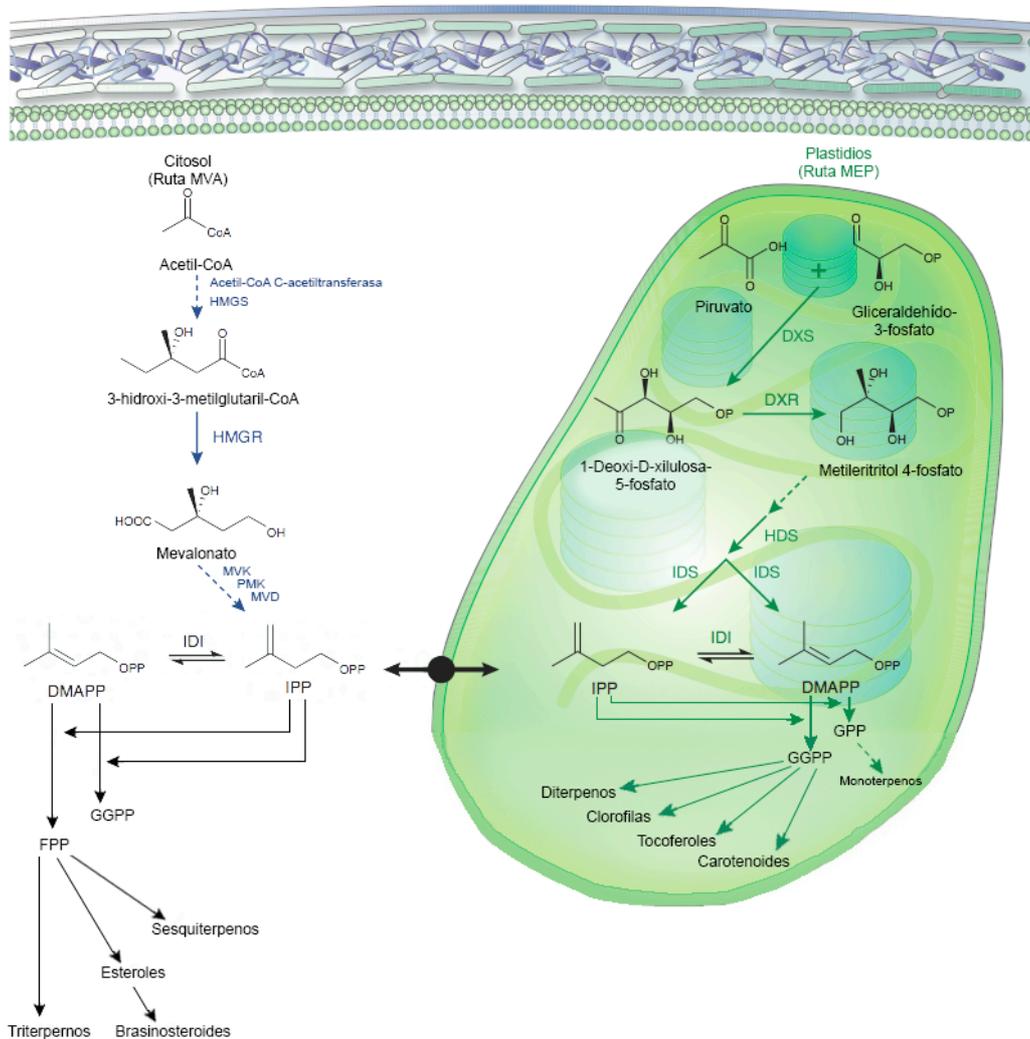


Figura 1.6. Ruta biosintética de los compuestos isoprenoides en las células vegetales. Ruta del ácido mevalónico (MVA) en el citosol y ruta del metileritritol-4-fosfato (MEP) en los plastos. Enzimas de la ruta MVA: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (HMGS), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), mevalonato quinasa (MVK), fosfomevalonato quinasa (PMK), mevalonato pirofosfato descarboxilasa (MVD). Enzimas de la ruta MEP: 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR); hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa (HDS), hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa (HDR). Adaptado de Roberts (2007).

La enzima clave de esta ruta es la HMG CoA reductasa, que está localizada en el RE y está codificada por una familia multigénica (Rodwell et al., 2000). Estos genes presentan un patrón de expresión muy complejo que difiere en función del tipo de órgano, estímulos ambientales y hormonales (Chappell et al., 1995; Luthra et al., 1999).

II.2.2.2. Ruta del metileritritol-4-fosfato (MEP)

En los plastos el IPP se forma por la condensación del piruvato y del gliceraldehído-3-fosfato por acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) sintasa (DXS), dando lugar a 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato (DXP) que tras experimentar un segundo reordenamiento intramolecular y una reducción, por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato reductoisomerasa (DXR), produce metileritritol-4-fosfato (MEP), que se convertirá en IPP (Schwender et al., 1999) (Figura 1.6).

II.2.3. Esteroles vegetales o fitosteroles

Los fitosteroles o esteroides vegetales son triterpenos policíclicos de estructura muy similar a la del colesterol: contienen 28 ó 29 C y uno o dos dobles enlaces, normalmente, uno en el sistema tetracíclico del esterano y otro en la cadena lateral alquilo, en C17, pero poseen un grupo metilo o etilo en C24 (Moreau et al., 2002). En plantas se han identificado más de 200 tipos de esteroides y se encuentran en las membranas celulares. En general, los fitoesteroides contribuyen a la estabilización de las membranas y a la regulación de la permeabilidad y fluidez de las mismas (una ratio elevada esterol/fosfolípido aumenta la rigidez) (Piironen et al., 2000; Posé et al., 2009). Entre los más abundantes se encuentran el β -sitosterol, seguido del campesterol y del estigmasterol que representan $\geq 95\%$ de todos los esteroides (Lagarda et al., 2006; Boutté y Grebe, 2009). Sin embargo, cada fitoesterol ejerce un efecto diferencial sobre la permeabilidad y fluidez de la membrana: por ejemplo, el estigmasterol es menos eficiente que el sitosterol en la regulación de la permeabilidad. Por otro lado, la relación molar entre el estigmasterol y otros fitoesteroides en el plasmalema aumenta durante la senescencia (Moreau et al., 2002, y referencias en el artículo).

II.2.3.1. Biosíntesis de los fitosteroles

Los triterpenos y los esteroides (subclase de triterpenos) proceden de la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP). Esta reacción está catalizada por la enzima escualeno sintasa (SS) y da lugar al escualeno (C30), que es el precursor de los triterpenos, en consecuencia la SS desempeña un papel clave en la regulación de la biosíntesis de estos compuestos (Abe et al., 1993; Devarenne et al., 2002) (Figura 1.7).

El mecanismo de ciclación del escualeno se inicia tras una oxidación, lo que hace que muchos triterpenos presenten un grupo hidroxilo en la posición 3. Si el escualeno adopta una configuración silla-silla-silla-bote, conduce a la formación de un grupo de compuestos triterpénicos con cinco ciclos, de tipo taraxasterano y oleano, entre otros (catión damarenilo, Figura 1.7). Si la configuración espacial del escualeno es silla-bote-silla-bote, puede dar lugar a cicloartenol, a partir del cual se forman los fitoesteroides mediante una serie de reacciones, entre las que figuran la eliminación de los grupos metilo de las posiciones 4 y 14, la apertura del ciclopropano entre las posiciones 9-10 y las modificaciones de la cadena lateral C17. Una vez sintetizados, estos compuestos se caracterizan por poseer el sistema tetracíclico del esterano en trans y por presentar un grupo hidroxilo en C3 y modificaciones en la cadena lateral C17 (Piñol et al., 2008).

Las enzimas que catalizan estas ciclaciones del 2,3-óxido de escualeno se denominan óxido de escualeno ciclasas (OSC; EC 5.4.99.x) y la gran diversidad estructural de los triterpenos, con más de 100 esqueletos carbonados diferentes, se debe a diferentes tipos (más de 50) de OSCs (Xu et al., 2004).

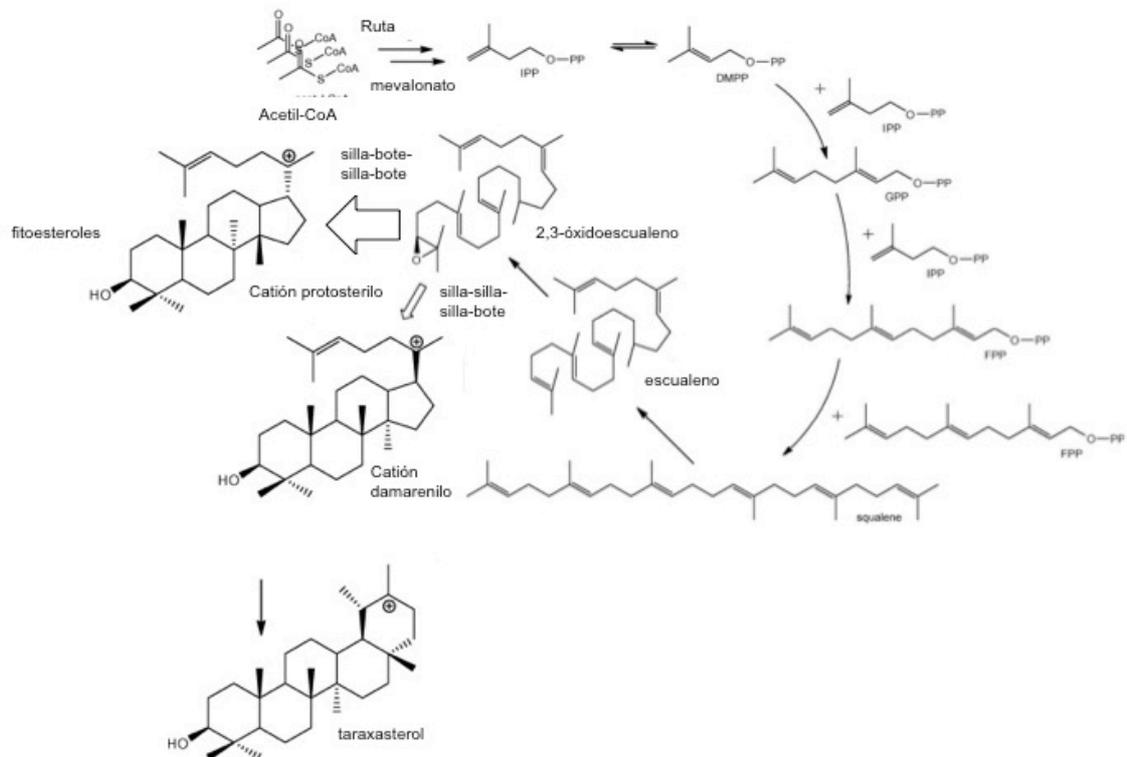


Figura 1.7. Primeras etapas de la ruta biosintética de los fitosteroles y ciclación del 2,3-óxido escualeno. Adaptado de Xu et al. (2004).

II.2.3.2. Funciones fisiológicas de los fitosteroles

Los fitosteroles son compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos eucariotas, ya que son componentes estructurales de las membranas celulares y sirven, además, de precursores para la biosíntesis de hormonas esteroideas, como los brasinosteroides (Moreau et al., 2002).

No obstante, la identificación de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con diferentes perfiles de acumulación de esteroides, debido a la disrupción de enzimas aguas abajo de la formación de escualeno, ha sido esencial para el establecimiento de las funciones biológicas de estos compuestos (Schaller, 2004). Algunos de esos mutantes son letales debido a que presentan múltiples defectos en el desarrollo embrionario, formación de tejidos vasculares y biogénesis plastidial, entre otros (Posé et al., 2009, y referencias en

el artículo). Algunos de estos efectos sobre el desarrollo pueden explicarse, al menos parcialmente, por el papel esencial de los esteroides en la señalización de hormonas, como el etileno (Souter et al., 2002 y 2004), y por la incapacidad para establecer una adecuada polaridad celular y, en consecuencia, una localización aberrante de los transportadores auxínicos de salida PIN1 y PIN3 (Willemsen et al., 2003; Men et al., 2008).

Por otro lado, los esteroides de membrana son necesarios para el correcto tráfico de vesículas (Boutté y Grebe, 2009) y regulan la actividad de las proteínas de membrana, bien como moduladores directos, como por ejemplo el estigmasterol que modula la actividad ATPasa de protones del plasmalema (Grandmougin-Ferjani et al., 1997), bien mediante la organización lateral de los componentes de la bicapa lipídica en microdominios especializados (*lipid rafts*) (Roche et al., 2008; Kierszniowska et al., 2009). En ese sentido, se han presentado diversas evidencias que sugieren que estos microdominios, ricos en esteroides y esfingolípidos, pueden jugar un papel importante en el reclutamiento de componentes moleculares implicados en las rutas de señalización relacionadas con la defensa (Grebe et al., 2004; Mongrand et al., 2004; Bhat y Panstruga, 2005; Laloï et al., 2007).

También se les ha atribuido a los fitosteroides un papel relacionado con la defensa de las plantas frente al estrés, ya que estos compuestos son importantes en la localización de las NADPH oxidasas de membrana requeridas para la regulación de ROS y la tolerancia a sequía (Posé et al., 2009). En plantas de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de la enzima HMGS, parece estar implicada en el aumento de la resistencia frente a *Botrytis cinerea* (Wang et al., 2012). Griebel y Zeier (2010) analizaron la composición lipídica foliar durante la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* y observaron un aumento significativo de estigmasterol. Comprobaron que los niveles de estigmasterol estaban relacionados con la susceptibilidad al patógeno, ya que mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar estigmasterol a partir de β -sitosterol, eran resistentes a *P. syringae*.

III. Producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro*

La obtención de metabolitos secundarios a partir de extractos vegetales constituye la base de una importante actividad económica, pero debido a la sobreexplotación de las especies productoras en la naturaleza, algunos de ellas en peligro de extinción, cada vez existen más inconvenientes para la continuidad de estos procedimientos que, hoy por hoy, no tienen una solución técnicamente viable. Existen alternativas de producción de carácter biotecnológico que se basan en la utilización de los cultivos vegetales *in vitro*.

La síntesis de estos metabolitos mediante la utilización de sistemas biológicos constituye un área emergente y de gran potencial de crecimiento, ya que representa una alternativa a los procesos clásicos de extracción de materia prima vegetal o a la síntesis química convencional. Los cultivos de células pueden iniciarse a partir de callos. Los callos originados en cultivo *in vitro* se forman al depositar un fragmento de tejido vegetal (explanto) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización que mantenían en el tejido original (Thorpe, 1980; Wagley et al., 1987) mediante el proceso conocido como desdiferenciación. Las suspensiones celulares se obtienen mediante la transferencia de una porción de callo friable a un medio de cultivo líquido. Estas suspensiones celulares deben estar en agitación para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células. Tanto el cultivo de callos como el de células en suspensión se emplean para la regeneración de plantas por organogénesis y embriogénesis somática. También se utilizan para la obtención de metabolitos secundarios. Una de las condiciones más importantes a la hora de iniciar un cultivo *in vitro*, es la elección del explanto del cual derivará el cultivo. Así, callos procedentes de un mismo explanto pueden presentar diferencias en cuanto a su morfología y características intrínsecas, como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos. Por ello, lo más apropiado es seleccionar aquél que combine una buena tasa de síntesis y acumulación de los productos de interés, siendo imprescindible que retenga la capacidad para expresar la ruta de síntesis del compuesto de interés en cultivo. Por ello, la optimización de la producción de metabolitos incluye el

establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo y el ajuste óptimo de los parámetros de crecimiento celular.

Cuando también se quiere comercializar el producto a nivel industrial es necesario realizar un escalado en sistemas que garanticen la producción elevada del metabolito de interés (utilizando biorreactores) para alcanzar niveles económicamente rentables. Ramachandra y Ravishankar (2002) señalan algunas de las ventajas tecnológicas del uso de cultivos de órganos y células vegetales *in vitro* en la producción de metabolitos secundarios, como: 1) los cultivos se pueden seleccionar para la producción específica del compuesto deseado y mantenerse indefinidamente, 2) independencia de factores geográficos, estacionales y ambientales, al que se encuentran sometidas las plantas cultivadas, 3) posibilidad de sistemas de producción estables, que aseguren la obtención continua de producto, con calidad y productividad uniformes, 4) escasos requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción, 5) sistemas renovables que proporcionan poblaciones uniformes, 6) proceso de purificación del producto de interés más fácil siendo óptimo cuando el producto se libera al medio, 7) permite la síntesis de compuestos que no se pueden obtener por otros métodos o por cultivos agronómicos, 8) producción del compuesto de interés a gran escala, 9) permite el estudio de rutas biosintéticas, aislamiento de enzimas, regulación del metabolismo y acumulación de estos compuestos, 10) utilización a nivel genético para clonar genes de enzimas reguladoras una vez purificadas y, 11) existe una mayor especificidad de transformación biológica que en la síntesis química, como por ejemplo, en la obtención de isómeros.

Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que ofrecen los cultivos de células vegetales, la producción de metabolitos secundarios mediante el uso de esta tecnología presenta aún numerosas limitaciones, siendo los principales obstáculos, la inestabilidad de las líneas celulares, el bajo rendimiento en la obtención del producto, lenta velocidad de crecimiento y problemas de escalado, siendo la productividad obtenida poco competitiva para su aplicación industrial. No obstante, y a pesar de esas limitaciones, actualmente se están comercializando varios metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo de células vegetales, tales como la siconina, los ginsenósidos, morfina y berberina obtenidos a partir de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*,

Panax ginseng, *Papaver somniferum* y *Coptis japonica*, respectivamente (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

Por ello, en las últimas décadas y gracias al avance de las disciplinas “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, entre otras), las estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro* se centran fundamentalmente en: 1) el estudio de las vías de transducción de la señal que conducen a la biosíntesis de metabolitos secundarios, 2) el estudio de los factores de transcripción y su mecanismo de regulación, incluyendo la manipulación de genes reguladores para mejorar la producción de metabolitos secundarios, 3) la clonación de los genes que codifican para enzimas clave en la ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios de interés, y la modificación de los genes que dirigen el flujo metabólico hacia los compuestos diana, 4) el estudio del flujo metabólico y del perfil metabólico de los intermediarios de la ruta de biosíntesis para conocer las rutas completas y la regulación de la acumulación de los compuestos diana, 5) el estudio de la transcripción génica del metabolismo secundario mediante el estudio y análisis del perfil de expresión génica en diferentes condiciones, con el fin de comprender la regulación del metabolismo secundario en todo su conjunto, y 6) la manipulación de los cultivos celulares para mejorar la productividad de los compuestos diana, a través de la selección del material vegetal y la optimización de las condiciones de cultivo, el cultivo de células diferenciadas, la inmovilización de las células vegetales y el empleo de elicitores (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Mora-Pale et al., 2014).

IV. Elicitación como herramienta para la obtención de metabolitos secundarios

La elicitación se puede definir como “la inducción o aumento de la biosíntesis de metabolitos debido a la adición de pequeñas cantidades de elicitores” y los elicitores como compuestos de diferentes orígenes que, introducidos en pequeñas concentraciones en un sistema celular vivo, son capaces de alterar el metabolismo, consiguiendo incrementar la producción de un metabolito en particular (Radman et al., 2003; Zhao et

al., 2005). El empleo de elicitores es quizás hoy en día el método más común para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de células vegetales. En este sentido, mientras que la planta responde a la presencia de elicitores, sintetizando metabolitos de forma localizada allá donde se produce la interacción, el cultivo celular responde globalmente, ya que el elicitador entra en contacto con toda la biomasa celular. Por lo tanto, la cantidad total de metabolitos sintetizados es mucho mayor que en las plantas y está en función de la biomasa de células elicitada.

Existen gran cantidad de elicitores que, según su origen, pueden ser clasificados en bióticos y abióticos (Tabla 1.5) (Ramachandra y Ravishankar, 2002; Radman et al., 2003; Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Cai et al., 2012).

Tabla 1.5 Clasificación de los elicitores.

Clasificación de los elicitores			
Bióticos		Abióticos	
Composición definida	Composición compleja	Químicos	Físicos
Ciclodextrinas	Homogenado fúngico	Sales metales pesados	Radiación UV
Jasmonatos	Extracto de levadura	Fosetil aluminio	Estrés térmico
Acido salicílico	Esporas de hongos	Ozono	Estrés osmótico
Etefón (etileno)		Benzotiodiazol	Heridas
Pectina			
Quitina			

Entre algunos de los ejemplos de elicitores abióticos se encuentran la luz UV (Zapata et al., 1994; Almagro et al., 2011b), metales pesados (Zheng y Wu, 2004), fosetil de aluminio (López-Serrano et al., 1994), ortovanadato (Tassoni et al., 2005), benzotiodiazol (Iriti et al., 2004) y ozono (Sgarbi et al., 2003) y, entre los bióticos, el extracto de levadura (Sánchez-Sampedro et al., 2005), ácido DL- β -aminobutírico (Pajot et al., 2001), oligosacáridos cíclicos (Bru et al., 2006), JA y MJ (Ament et al., 2004; Belchí-Navarro et al., 2011; Zhang et al., 2002), SA (López-Orenes et al., 2013), fragmentos de paredes celulares de hongos (Ramachandra y Ravishankar, 2002), entre otros. En algunas revisiones incluso llegan a considerar como elicitador físico la propia herida que sufre la planta cuando es mordida por un herbívoro (Kessler y Baldwin, 2002).

Tras la percepción del elicitor por parte de proteínas receptoras de membrana tienen lugar los eventos tempranos, como la fosforilación/desfosforilación de proteínas o la activación de proteínas de membrana plasmática, que conducen a la movilización o a la generación de diversas moléculas señal, como calcio libre (Ca^{2+}), óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Mediante la descodificación de estas señales por proteínas sensibles a ellas, se producen las respuestas tardías a través de cambios transcripcionales, proteómicos y metabólicos. En última instancia, las vías de transducción de señales inducidas por elicitores promueven el refuerzo de paredes celulares con la deposición de calosa o lignina y la producción de metabolitos secundarios y la biosíntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) y enzimas antioxidantes (García-Brugger et al., 2006).

IV.1. Elicitación con jasmonato de metilo

El ácido jasmónico (JA) y el jasmonato de metilo (MJ) son moléculas señal que presentan una mayor actividad biológica en tejidos de crecimiento, como son los ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces (Wasternack y Hause, 2013 y referencias en el artículo). Derivan del ácido α -linolénico liberado desde los fosfolípidos de membrana por la acción de lipasas. El ácido linolénico, a través de una serie de etapas que incluyen lipoxidación, ciclación y β -oxidación (Wasternack, 2007) se transforma en JA y éste puede experimentar metilación y formar MJ por acción de la ácido jasmónico metiltransferasa (Seo et al., 2001; Wasternack y Hause, 2013) (Figura 1.8).

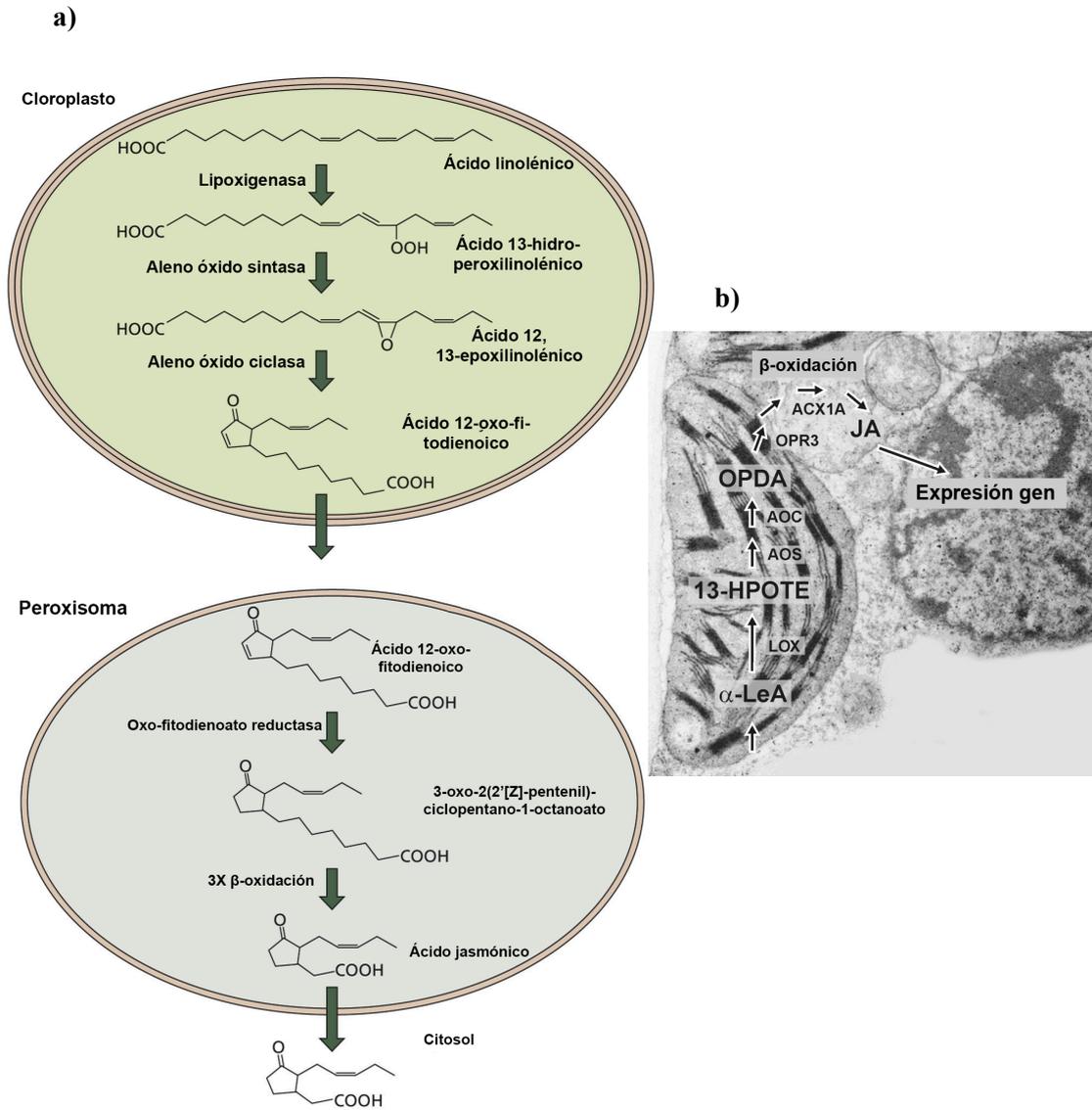


Figura 1.8. Ruta biosintética del ácido jasmónico (JA) en la que se muestran los intermediarios metabólicos desde el ácido α -linolénico (α -LeA) hasta JA. Las primeras etapas enzimáticas tienen lugar en los cloroplastos y se obtiene ácido 12-oxo-*cis*-fitodienoico (OPDA). La localización de las enzimas se muestra mediante un esquema (a) y mediante una micrografía electrónica de barrido de una célula del mesófilo de cebada (b). Lipoxigenasa (LOX), ácido (13*S*)-hidroperoxioctadecatrienoico (13-HPOTE), 13-aleno óxido sintasa (13-AOS), aleno óxido ciclasa (AOC), OPDA reductasa (OPR), acil-CoA oxidasa (ACX). Adaptado de Taiz y Zeiger (2010) y Wasternack (2007).

Numerosos estudios demuestran que el JA y el MJ, regulan muchos procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el desarrollo, la fertilidad y la senescencia (Devoto y Turner, 2003; Cheong y Choi, 2003; Wasternack, 2007; Wasternack y Hause, 2013) y están implicados en la señalización local y sistémica del estrés biótico y abiótico, así como en la regulación de la expresión de genes relacionados con la defensa (Pauwels et al., 2008; Frenkel et al., 2009; Clarke et al., 2009). De hecho, en tomate o tabaco, los jasmonatos también son capaces de inducir la expresión de genes que codifican para proteínas PR tales como quitinasas y β -1,3-glucanasas (Wu y Bradford, 2003; Fukuda y Shinshi, 1994), que juegan un papel en el sistema de defensa de la planta (Kasprzewska, 2003). Asimismo, en cultivos celulares de *Capsicum* spp. (Sabater-Jara et al., 2010 y 2011) y *V. vinifera* (Belchí-Navarro et al., 2013), la adición de MJ induce la acumulación de proteínas relacionadas con la defensa, como quitinasas, 1,3- β -glucanasas y peroxidasa. Además, el MJ es capaz de inducir la acumulación de metabolitos secundarios, por ejemplo fitosteroles y triterpenos (Mandujano-Chavez et al., 2000; Martin et al., 2002; Lee et al., 2004; Mangas et al., 2006; Sabater-Jara et al., 2010), capsaicina (Sudha y Ravishankar, 2003), taxanos (Kim et al., 2005), *trans*-resveratrol (Ragab et al., 2006; Belchí-Navarro et al., 2012), ajmalicina (Almagro et al., 2011a), ácido rosmarínico (Kikowska et al., 2012) y cafeoilputrescina (Chen et al., 2006), entre otros.

IV.2. Elicitación con oligosacáridos cíclicos (ciclodextrinas)

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos que contienen varias unidades de glucopiranosas unidas por medio de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, conformando un anillo. Estos compuestos se forman por la degradación de la molécula de almidón por la acción de la enzima ciclodextrín-glicosil-transferasa (Szente y Szejtli, 2004) que son segregadas por distintos microorganismos del género *Bacillus* (Nakamura y Horikoshi, 1977). Las ciclodextrinas más comunes son: α -ciclodextrina, que contiene seis unidades de glucosa, β -ciclodextrina con siete unidades de glucosa y γ -ciclodextrina que contiene 8 unidades de glucosa (López-Nicolás et al., 2006; Figura 1.9).

Las moléculas de ciclodextrinas tienen un extremo que contiene grupos hidroxilo primarios, en el otro extremo grupos hidroxilos secundarios y en el interior de la

cavidad los grupos CH y oxígenos glicosídicos. Estos extremos de la ciclodextrina que contienen los grupos hidroxilo son bastante polares, mientras que su interior es relativamente no polar (Bru et al., 2006). Como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres estén situados en la superficie de los anillos, las CDs son hidrófilas y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso (López-Nicolás y García-Carmona, 2008).

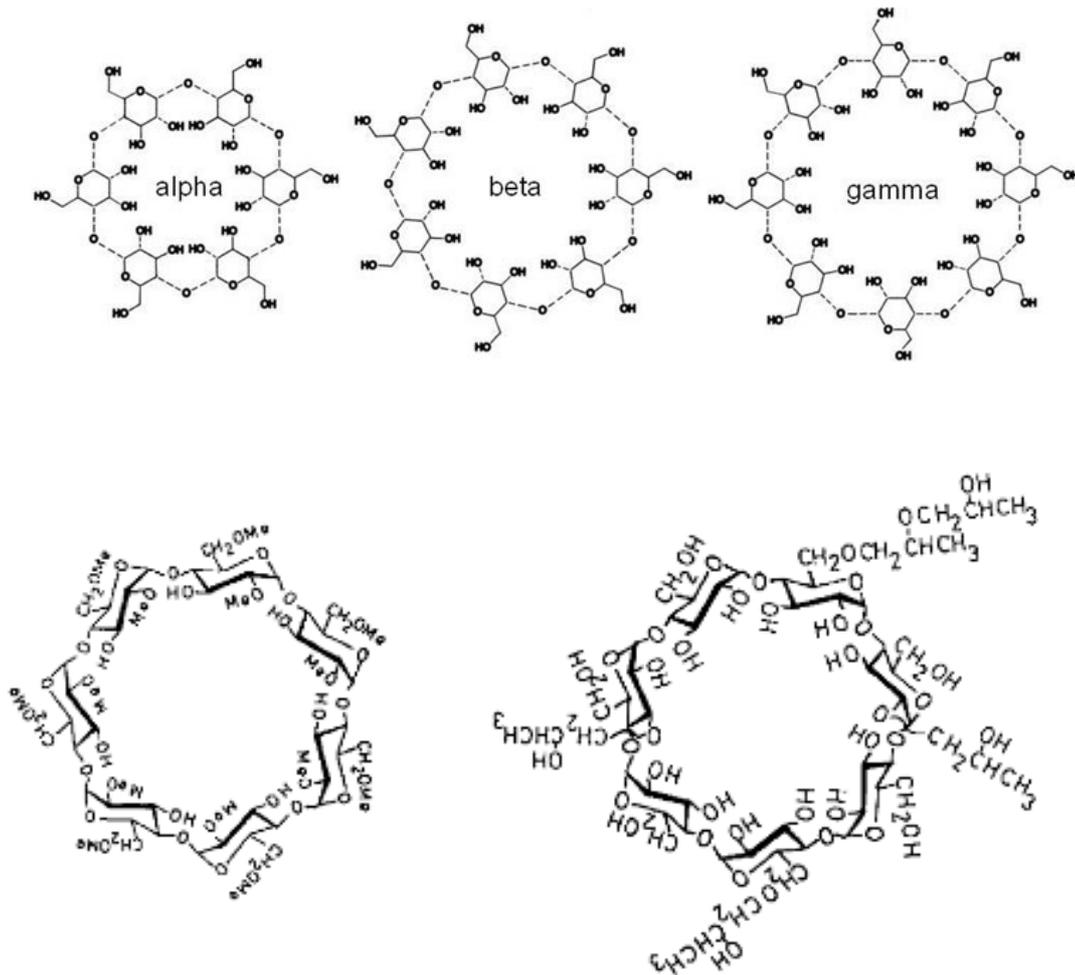


Figura 1.9. Esquema de las α -, β - y γ -CDs (arriba) y de dos tipos de β -CDs: heptakis 2,6-di-O-metil- β -CD y 2-hidroxiopropil- β -CD (abajo). Adaptado de Szejtli (2004).

Entre las CDs producidas de forma industrial se encuentran dos derivados de la β -CD: las metiladas (heptakis 2,6-di-O-metil- β -CD, también conocidas como DIME β) y las hidroxipropiladas (2-hidroxiopropil- β -CDs), sus pesos moleculares son de 1331 y de 1400 Da, respectivamente, y su solubilidad en agua es muy alta (> 500 y > 600 mg/cm³)

(Figura 1.9). Las modificaciones que presentan estas CDs son de especial relevancia, ya que las β -CDs sin modificar tienen una elevada afinidad por el colesterol y su solubilidad en agua es inferior a la que presentan sus derivadas y a las α - y γ -CDs (a 25 °C, en H₂O, 18 mg/cm³) (Szejtli, 2004).

Las CDs se caracterizan por su capacidad de formar complejos de inclusión. La cavidad interior de las CDs es apolar, por lo que son capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas para formar los complejos (López-Nicolás et al., 1995). En consecuencia, moléculas insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles en disoluciones acuosas de CDs, sin que se produzcan modificaciones químicas en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre las CDs y la molécula insoluble en agua (Belchí-Navarro et al., 2012) (Figura 1.10).

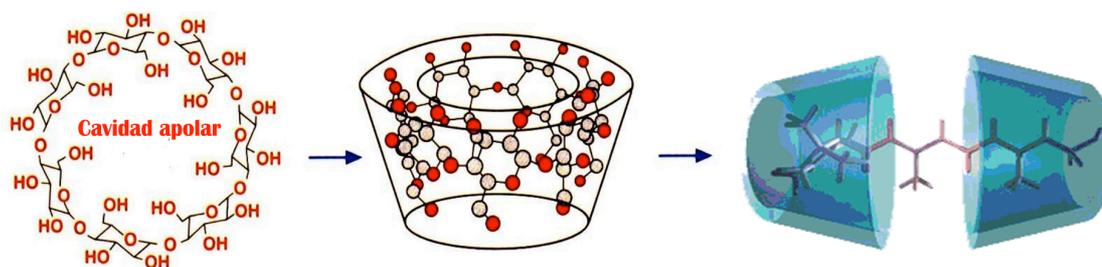


Figura 1.10. Formación de complejos de inclusión con CDs. Tomado de Almagro (2011).

Las CDs tienen numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, ya que se han usado como agentes complejantes para incrementar la solubilidad de varios compuestos, tales como drogas, fragancias, vitaminas y colorantes alimentarios (Loftsson y Brewster, 1996; Buschmann y Schollmeyer, 2002). Así, por ejemplo, en la industria farmacéutica se emplean como agentes solubilizadores para mejorar las propiedades físico-químicas de los fármacos o para incrementar la biodisponibilidad de compuestos poco solubles en agua. Asimismo, en la industria cosmética y alimentaria, las CDs han sido ampliamente utilizadas como estabilizantes de aromas y fragancias, para la eliminación de sabores desagradables y otros compuestos no deseados (Del Valle, 2004).

Existen numerosos estudios en los que se han utilizado las CDs como agentes capaces de inducir respuestas de defensa en cultivos celulares vegetales, actuando, por tanto, como verdaderos elicitores (Zamboni et al., 2009; Sabater-Jara et al., 2010; Almagro et al., 2011a; Belchí-Navarro et al., 2013). Así, los estudios realizados en cultivos celulares de *Vitis vinifera* ponen de manifiesto que la incubación de estas células con β -CDs, a una concentración que resulta inocua para las células (50 mM), es capaz de inducir respuestas de defensa en dichas células, tales como la biosíntesis de *trans*-resveratrol (fitoalexina del género *Vitis*), así como cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican para enzimas clave de la ruta de biosíntesis de los estilbenos (Bru et al., 2006; Lijavetzky et al., 2008). En 2006, Bru et al. apoyaron la idea de que las CDs actuaban como elicitores de la síntesis de *trans*-resveratrol, ya que la fracción de las pectinas de las paredes celulares contiene éteres y ésteres, derivados de azúcares tales como metil galacturonato, 3-acetil galacturonato, 2-*O*-metil xilosa y 2-*O*-metil-4-acetil mucosa y el tratamiento de una suspensión celular con enzimas pectolíticos libera oligosacáridos de pectina, los cuales actúan como elicitores de la síntesis de fitoalexinas (Negrel y Javelle, 1995). En este sentido, las CDs modificadas se parecen a los oligosacáridos pécticos, alquil-derivados liberados de forma natural de las paredes celulares durante un ataque fúngico.

Además, Zamboni et al. (2009) estudiaron los perfiles génicos en cultivos celulares de vid elicitados con CDs después de 2 y 6 horas de tratamiento y observaron que las CDs inducen respuestas de defensa temprana, como la activación de proteín-quinasas o proteín-fosfatasa. Asimismo, las CDs desencadenan una cascada de transducción de la señal que activa diferentes familias de factores de transcripción que, a su vez, modulan la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis del *trans*-resveratrol, como la STS o la PAL, y la expresión de proteínas-PR, como quitinasas o PR 10, entre otras. Así, Sabater-Jara et al. (2010) demostraron que las CDs estimulaban la biosíntesis de fitoalexinas de naturaleza sesquiterpénica, como la solavetivona, y de compuestos terpenoides en cultivos celulares de pimiento. Belchí-Navarro et al. (2011) también han descrito un aumento de la síntesis y de la acumulación de silimarinas (una mezcla isomérica de flavolignanones farmacológicamente activos, formadas por el acoplamiento

oxidativo de taxifolina y alcohol coniferílico) en el medio extracelular de cultivos celulares de *Sylibum marianum* tras la elicitación con CDs. Asimismo, los resultados obtenidos por Almagro et al. (2012) en cultivos celulares de *N. tabacum* demuestran el efecto inductor de las CDs en la producción de capsidiol. Además, recientemente, Belchí-Navarro et al. (2013) encontraron que las CDs inducen la acumulación de proteínas relacionadas con la defensa, como quitinasas, 1,3- β -glucanasas y peroxidasas. Por lo tanto, la elicitación con CDs, además de inducir la acumulación de proteínas relacionadas con la defensa, también incrementa la producción de metabolitos secundarios, principalmente aquellos relacionados con la defensa, mediante la inducción de la expresión de los genes responsables de su biosíntesis, lo que permite su acumulación en el medio extracelular. Además, como las CDs son capaces de formar complejos de inclusión con los metabolitos inhiben los procesos de retroinhibición biosintética por acumulación del producto final y asimismo evitan la muerte celular causada por la acumulación excesiva del metabolito.

V. Proteínas extracelulares

La matriz extracelular o espacio extracelular (EEC) se utiliza generalmente para referirse a "todo lo que se encuentra fuera de la membrana plasmática" y está compuesto por la pared celular y el espacio intercelular, en el que los productos se mueven libremente. A ese fluido que se localiza dentro del EEC se le denomina líquido apoplástico o fluido extracelular y está compuesto por una mezcla compleja de carbohidratos, lignina, proteínas secretadas, como las enzimas digestivas, metabolitos, compuestos inorgánicos y otras muchas sustancias (Haslam et al., 2003; Agrawal et al., 2010).

En el apoplasto se llevan a cabo numerosas funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la expansión celular, la osmorregulación, el intercambio gaseoso, señalización, reconocimiento célula-célula, destoxificación, y defensa frente al estrés tanto abiótico como biótico (Grignon y Sentenac, 1991; Ellis et al., 2007; Jung et al., 2004). En este sentido, la pared celular se considera un compartimento dinámico que juega un papel crucial, no sólo en el crecimiento y expansión celular, sino también en la interacción

con los factores ambientales, incluyendo los que se requieren para la nutrición y defensa ante el estrés ambiental o frente al ataque de patógenos (Pignocchi et al., 2006).

Asimismo, las proteínas secretadas en el líquido apoplástico incluyen tanto proteínas constitutivas como las que son secretadas en respuesta a señales ambientales. De hecho, se ha propuesto la co-existencia de dos tipos diferentes de orgánulos secretores en las células: los orgánulos secretores constitutivos y los regulados (Brunner et al., 2009). Los orgánulos secretores constitutivos (o vía secretora constitutiva) son capaces de liberar su contenido de forma independiente de cualquier estímulo extracelular o intracelular. Por el contrario, el proceso de secreción de los orgánulos secretores regulados (o vía secretora regulada) es controlado por estímulos extracelulares y/o intracelulares que son específicos del tipo celular (Agrawal et al., 2010). La ruta del RE/Golgi es un proceso de secreción clásico bien conocido y ampliamente caracterizado en los organismos multicelulares, tanto en plantas como en animales. En esta vía, las proteínas integrales de la membrana plasmática, así como las proteínas secretadas, se sintetizan típicamente en el RE y pasan a través del aparato de Golgi, aunque algunas vesículas secretoras pueden pasar por alto el aparato de Golgi en su camino hacia la vacuola (Dupree, 1999). Por lo tanto, ambos orgánulos secretores cooperan y regulan el normal funcionamiento de la ruta RE/Golgi. El término secretoma se define como "el conjunto de las proteínas secretadas en el espacio extracelular por una célula, tejido, órgano u organismo en cualquier momento dado y bajo determinadas condiciones, a través de mecanismos de secreción conocidos y desconocidos que implican orgánulos secretores constitutivos y regulados" (Agrawal et al., 2010).

Debido a la importancia del apoplasto se hace necesaria una identificación fidedigna de las proteínas procedentes de este compartimento con el fin de determinar su función. La ventaja que ofrece el uso de suspensiones celulares es que, durante el aislamiento de las proteínas, el daño celular es mínimo o no se produce (Kusumawati et al., 2008). Así, el medio extracelular en el que crecen los cultivos celulares vegetales puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de la célula vegetal (Kärkönen y Koutaniemi, 2010). Por esta razón, las suspensiones celulares constituyen una fuente óptima para el aislamiento, identificación y caracterización de

proteínas localizadas en la pared celular, ya que el espacio intercelular, en este caso el medio extracelular, se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas (Sabater-Jara et al., 2014).

A pesar de la importancia de estas proteínas en el estrés ambiental o frente a patógenos, en el reconocimiento célula-célula y en el desarrollo, siguen siendo menos conocidas que otros compartimentos celulares y esto es en parte debido a la incapacidad para obtener el material apoplástico sin dañar el material vegetal y contaminar las muestras con proteínas citoplásmicas. Se han utilizado distintas herramientas en el análisis del proteoma con el fin de investigar y entender las funciones de las proteínas secretadas. Así, el uso de las técnicas electroforéticas, la disponibilidad de la secuencia del genoma y los recientes avances en la tecnología de espectrometría de masas (Wu et al., 2006), han hecho posible identificar las proteínas de un tejido u órgano dado (Rose et al., 2004). En comparación con otros métodos para el aislamiento de proteínas de la pared celular, tales como la infiltración al vacío (Boudart et al., 2005; Zhu et al., 2006) y el fraccionamiento subcelular (Chivasa et al., 2002; Watson et al., 2004), el medio extracelular de una suspensión celular puede ser fácilmente separado de las células sin ruptura celular proporcionando una fuente conveniente, continua y única de las proteínas de la pared celular (Chivasa et al., 2006).

V.1. Proteínas relacionadas con la patogénesis

Las plantas poseen mecanismos constitutivos o inducibles en respuesta al ataque de patógenos, muchos de los cuales implican la expresión de numerosos conjuntos de genes que codifican proteínas con funcionalidades muy diversas, entre las que destacan aquellas que tienen un papel activo en la defensa ante este estrés. Así, uno de los componentes cruciales en este repertorio inducible de mecanismos de auto-defensa de la planta se sitúa en la producción y/o acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, pathogenesis related). Las proteínas PR fueron descubiertas por Van Loon y Van Kammen (1970) tras los primeros avances en las técnicas electroforéticas de proteínas en plantas de tabaco durante una respuesta hipersensible debido a la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*).

Posteriormente, se encontró que estas proteínas se inducían también por infecciones de hongos y bacterias en numerosas especies de plantas (Redolfi, 1983). A día de hoy se han identificado proteínas PR en numerosas mono- y dicotiledóneas de diferentes géneros, por lo que se puede considerar que se encuentran distribuidas de un modo ubicuo en el reino vegetal. El término PR hace referencia a aquellas proteínas que no sólo se encuentran a concentraciones detectables en tejidos sanos, sino que su acumulación se ha demostrado en condiciones patológicas y situaciones relacionadas en, al menos, dos o más combinaciones planta-patógeno (Van Loon et al., 2006). El término “condiciones patológicas” en este caso se utiliza para indicar el ataque directo de patógenos de diverso origen, tales como hongos, bacterias, virus, insectos y herbívoros. Además, también se incluyen: la aplicación de compuestos químicos que mimetizan el efecto del ataque por un patógeno (hormonas, como etileno, ácido salicílico y ácido jasmónico) y las respuestas a heridas que dan lugar a proteínas que se acumulan durante la infección (Sels et al., 2008). Van Loon et al. (2006) establecieron una clasificación de las PRs en 17 familias según sus secuencias nucleotídicas o proteicas y sus propiedades (Tabla 1.6).

Las familias fueron enumeradas de acuerdo al orden en que se identificaron. Así, la familia PR-1 fueron las primeras en ser identificadas en la interacción tabaco/virus TMV y son las que se acumulan en mayor cantidad en el tejido infectado (Buchel y Linthorst, 1999). A pesar de ser muy abundantes, no se conoce con exactitud su función, aunque se ha descrito que algunas de ellas presentan actividad antifúngica. En esta familia se encuentran tanto proteínas ácidas como básicas. Son proteínas de un peso molecular comprendido entre 14-17 kDa. La familia PR-2 contiene proteínas con actividad β -1,3-glucanasa. Las glucanasas de clase I son proteínas básicas y vacuolares, mientras que las de clase II son ácidas y extracelulares. El modo de acción se basa en su capacidad para hidrolizar los β -1,3-glucanos presentes en la pared celular de hongos. Como resultado de su actividad hidrolítica se pueden liberar fragmentos de la pared del hongo que son reconocidos por la planta y que funcionan como elicitores de la respuesta inducida. Además de participar en la defensa vegetal, las β -1,3-glucanasas participan también en los procesos de desarrollo normal de la planta, como la germinación del polen, fertilización, embriogénesis, maduración del fruto, germinación de las semillas y

la movilización de las reservas del endospermo de cereales (Leubner-Metzer y Meins, 1999).

Tabla 1.6. Clasificación de las PRs según Van Loon et al. (2006) modificado.

Familia	Miembro tipo	Mr (kDa)	Propiedades
PR-1	PR-1a de tabaco	15	Antifúngica
PR-2	PR-2 de tabaco	30	β -1,3-glucanasa
PR-3	PR-P, PR-Q de tabaco	25-30	Quitinasas clase I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	PR-R de tabaco	15-20	Quitinasas clase I, II
PR-5	PR-S de tabaco	25	Taumatina
PR-6	Inhibidor I tomate	8	Inhibidor de proteinasas
PR-7	P69 tomate	75	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de pepino	28	Quitinasa del tipo III
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina en tabaco	35	Peroxidasa
PR-10	PR-1 perejil	17	Similar ribonucleasa
PR-11	Quitinasa de clase V tabaco	40	Quitinasa clase I
PR-12	Rs-AFP3 rábano	5	Defensina
PR-13	THI2.1 Arabidopsis	5	Tionina
PR-14	LTP4 de cebada	9	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	OxOa (germina) de cebada	20	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de cebada	20	Similar a oxalato oxidasa
PR-17	PRp27	27	Desconocida

Las quitinasas son proteínas PR que pertenecen a las familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11. Son proteínas ácidas o básicas, con pesos moleculares entre 26 y 43 kDa, que se agrupan en cinco clases en función de sus características estructurales y funcionales. La familia PR-8 incluye quitinasas que tienen también actividad lisozima. Al igual que las β -1,3-glucanasas, las quitinasas también pueden encontrarse en tejidos vegetales de manera independiente a la infección. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en bacterias, hongos, animales y plantas (Kasprzewska, 2003). Las quitinasas catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces β -1,4 glucosídicos presentes en

la N-acetilglucosamina (NAcGlc), siendo su principal sustrato la quitina, principal componente de la pared celular de muchos hongos y del exoesqueleto de invertebrados (Collinge et al., 1993; Kramer y Muthukrishnan, 2005). En ciertas plantas, la expresión de las glucanasas y las quitinasas se produce coordinadamente tras la infección por un patógeno, heridas o tratamiento con etileno y su aparición se ha relacionado con procesos de resistencia *in vitro* (Vögeli et al., 1988). La familia PR-5 se compone de proteínas denominadas tipo taumatina debido a la gran similitud de secuencia que presentan con la proteína taumatina del arbusto *Thaumatococcus danielli*. Al igual que las proteínas PR-1, se identificaron por primera vez en la interacción tabaco/TMV. Se trata de un grupo de proteínas de pequeño tamaño (25 kDa) cuya expresión se induce por infección viral y fúngica, así como en respuesta a estrés osmótico y heridas (Liu et al., 2010). Los inhibidores de proteasas componen la familia PR-6. Estas proteínas se acumulan de forma natural en órganos de reserva como semillas y tubérculos y también se inducen en respuesta a heridas, ya sea herida mecánica o causada por insectos fitófagos. Además de actuar frente a insectos, también se ha descrito que pueden actuar inhibiendo el crecimiento de hongos, aunque todavía se desconoce su mecanismo de acción (Heitz et al., 1999). La endoproteinasa P69 de tomate es el representante de la familia PR-7 y su expresión se induce en plantas infectadas por viroides (Vera y Conejero, 1988). La familia PR-9 incluye las peroxidasas, que pueden ser básicas o ácidas, vacuolares o extracelulares. Su función está directamente relacionada con la defensa ya que se encuentran implicadas en el reforzamiento de la pared celular, catalizando la deposición de ligninas en respuesta a la infección por patógenos o insectos (Almagro et al., 2009). Las PR-10 tienen como principal característica su localización citosólica y su actividad ribonucleasa (Datta y Muthukrishnan, 1999). Las familias PR-12, PR-13 y PR-14 incluyen las defensinas, tioninas y proteínas transportadoras de lípidos, respectivamente.

2. Objetivos

Como se ha comentado en la introducción, el cultivar de tomate MT presenta una serie de características fenotípicas, rápido crecimiento y pequeño tamaño, que hacen que sea más adecuado para estudios en laboratorio que otros cultivares de tomate. El objetivo general planteado al iniciar este trabajo fue determinar el comportamiento *in vitro* del cv. MT, así como llevar a cabo un estudio de los perfiles de metabolitos secundarios y de los patrones de expresión proteica en suspensiones celulares sometidas a la elicitación con MJ, en presencia y en ausencia de dos tipos de β -CDs: metiladas al azar (CDsM) o hidroxipropiladas al azar (CDsH). El fin último es explorar el potencial de las suspensiones celulares derivadas del cv. MT para utilizar este sistema en la producción de metabolitos con alto valor añadido. Para abordar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. El estudio del crecimiento de las suspensiones celulares de *S. lycopersicum* cv. MT.
2. La identificación/cuantificación de los metabolitos (fenoles y esteroides) presentes en las suspensiones celulares de *S. lycopersicum* cv. MT y de su evolución con el tiempo.
3. El análisis de la evolución del patrón de proteínas totales del medio extracelular e intracelular de las suspensiones celulares, así como de la evolución de la actividad peroxidasa y de los patrones isoenzimáticos de esta enzima durante el cultivo.
4. La identificación/cuantificación de metabolitos bajo condiciones de elicitación con MJ y/o CDs en suspensiones celulares de tomate cv. MT en fase exponencial.
5. El estudio de los patrones de expresión proteica en los cultivos celulares elicitados con CDs y/o MJ en fase exponencial.

3. Materiales y Métodos

I. Reactivos

Los reactivos utilizados procedieron de diferentes casas comerciales. Todos los disolventes orgánicos utilizados fueron de grado HPLC y se obtuvieron de Panreac (España), las CDsM metiladas de Wacker Chemie (Alemania) y el agar purificado de Pronadisa (España), el MJ de Duchefa (España), y el resto de compuestos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (España).

II. Material vegetal

En todos los experimentos recogidos en la presente memoria se utilizaron callos y suspensiones celulares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

II.1. Iniciación de la línea celular

La obtención de los cultivos celulares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom se llevó a cabo partiendo de frutos desarrollados en plantas cultivadas *in vitro*. Para la obtención de las plantas *in vitro* se partió de semillas de tomate de la citada variedad que, una vez desinfectadas en presencia de hipoclorito sódico al 0,5 % y Tween-80 al 0,25 % durante 15 min y lavadas con agua destilada y esterilizada, se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962) con la concentración de macronutrientes reducida a la mitad (MS/2), suplementado con las vitaminas descritas por Morel (Morel y Wetmore, 1951), vitaminas B1 y B3 y sacarosa al 3 % como fuente de carbono reducido (Tabla 2.1). El pH del medio se ajustó a 6,0 con 0,1 N KOH y éste se autoclavó a 121 °C, 20 min y 1,2 atmósferas (Stericlav-S Raypa).

Para la inducción de callo, los frutos desarrollados *in vitro* se cortaron en 8 porciones y se cultivaron en placas Petri que contenían un medio basal MS, suplementado con vitaminas de Morel, vitaminas B1 y B3, hidrolizado de caseína, sacarosa al 3 %, ácido alfa-naftalenacético (ANA) 2 mg/L y 6-benciladenina (BA) 2 mg/L (Tabla 2.1). Los cultivos se incubaron en oscuridad, a 25 °C. La aparición de los microcallos, a partir del mesocarpo de frutos cultivados *in vitro*, se observó 2-3 semanas después de la inducción.

Cuando se dispuso de suficiente biomasa, los callos se transfirieron a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 100 mL del medio de cultivo de mantenimiento, compuesto por la combinación de macro- y micronutrientes descrita por MS, vitaminas de Morel, hidrolizado de caseína 250 mg/L, sacarosa 3 %, ANA 0,86 mg/L, quinetina 0,11 mg/L, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 0,09 mg/L y agar 7,5 g/L, ajustándose el pH a 6,0 (Tabla 2.1). Los callos se mantuvieron en una cámara de cultivo (Sanyo Versatile Environmentat Test Chamber MRL351), a una temperatura de 25 °C, con un régimen de 16 h de luz (6 W/m²) y 8 h de oscuridad.

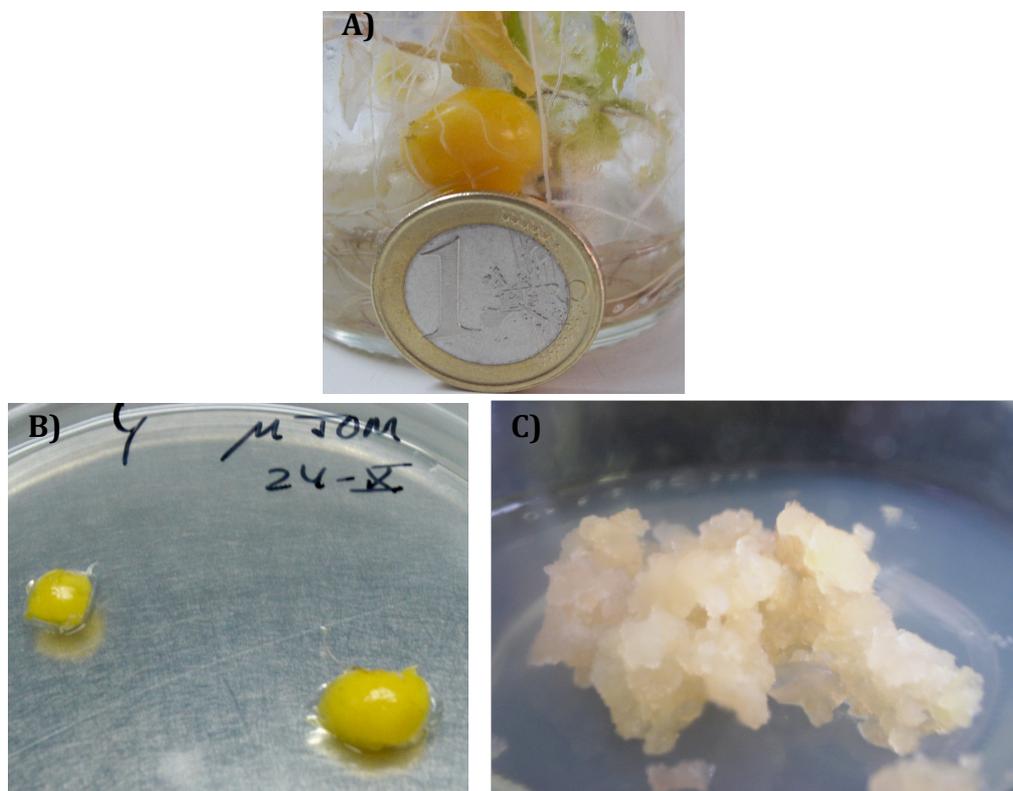


Figura 2.1. Diferentes fases del establecimiento de cultivos celulares derivados de frutos de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom. **A)** Frutos desarrollados en plantas cultivadas *in vitro*. **B)** Secciones de frutos inmaduros. **C)** Microcallo de tomate cv. MT.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo utilizado para la obtención de plantas in vitro, la inducción y mantenimiento de callos de tomate cv. MT

	Obtención plantas in vitro mg/L (μM)	Inducción de callo mg/L (μM)	Mantenimiento de callo mg/L (μM)
Medio basal	MS/2	MS	MS
Reguladores del crecimiento			
Quinetina	-	-	0,11 (0,51)
2,4-D	-	-	0,09 (0,41)
ANA	-	2 (10,74)	0,86 (4,61)
BA		2 (9,29)	
Vitaminas			
Pantotenato cálcico	1	1	1
Mioinositol	100	100	100
Biotina	0,01	0,01	0,01
Piridoxina	1	1	1
Tiamina	1	1	1
Ácido Nicotínico	1	1	1
Otros componentes			
Hidrolizado de caseína	-	250	250
Sacarosa	30000	30000	30000
pH	6,0	6,0	6,0

II.2. Mantenimiento de los callos e iniciación y mantenimiento de las suspensiones celulares

Los callos friables se subcultivaron cada 21 días (Figura 2.2A) y, tras seis meses de subcultivo, se utilizaron para la obtención de suspensiones celulares. Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la transferencia de 20 g de callo friable a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 100 mL del medio de cultivo sin agar descrito anteriormente para el mantenimiento de los callos, manteniéndose en agitación continua (105 rpm) y en las mismas condiciones de régimen de luz y temperatura que las descritas para los callos. Las suspensiones celulares se subcultivaron cada 16 días por transferencia de 50 mL de suspensión celular a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 50 mL de medio de cultivo fresco (Figura 2.2B) y se mantuvieron en agitación continua (105 rpm) en las condiciones de régimen de luz y temperatura descritas previamente.

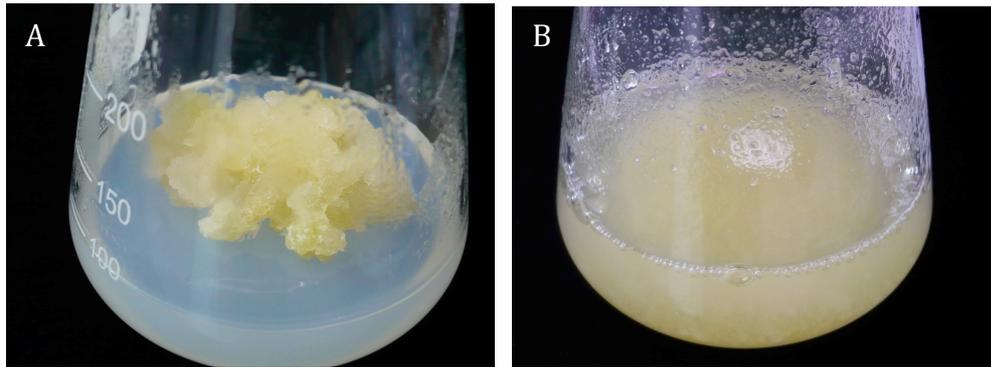


Figura 2.2. A) Callo de tomate cv. MT crecido en matraz y en luz durante 21 días de cultivo. B) Aspecto de la suspensión celular de tomate cv. MT a los 16 días de cultivo.

III. Medida del crecimiento celular

La curva de crecimiento se realizó a partir de suspensiones celulares bien establecidas, filtrándolas en condiciones asépticas. Las células filtradas se pesaron y 40 g de peso fresco de células se transfirieron a matraces de 500 mL de capacidad conteniendo 200 mL del medio de cultivo descrito anteriormente. Al día siguiente del inicio de la suspensión celular se realizó el primer muestreo; estos datos corresponden al primer punto de la curva, considerando éste como el tiempo cero (t_0). Los siguientes muestreos se realizaron con intervalos de 48 horas, durante un periodo de 25 días.

La tasa de crecimiento se obtuvo mediante la determinación del volumen de empaquetamiento celular (VEC) y de los pesos fresco y seco de las células. Además, se procedió a la determinación del pH y de la conductividad del medio extracelular. El VEC indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular. Para su determinación se tomaron dos alícuotas de 3-5 ml de suspensión, en agitación, por matraz y día de muestreo, utilizando una pipeta estéril para cada muestra. A continuación se centrifugaron a $99 \times g$, durante cinco minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, en una centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech. Se tomaron las lecturas del volumen total de la alícuota muestreada y del volumen de las células empaquetadas. Los resultados se expresaron en %. Una vez realizada la medida del VEC se separó el medio extracelular

de las células y se midió el pH del medio en un pH-metro Crison (modelo pH METER BASIC 20) y la conductividad del medio, con un conductímetro Crison (Modelo micro CM 2100). Para la medida del peso fresco las alícuotas recogidas de cada suspensión se filtraron con ayuda de una bomba de vacío hasta eliminar el medio extracelular. Posteriormente, las células se lavaron con agua destilada fría y se pesaron en una balanza de precisión GR-200 (modelo AND). Los resultados se expresaron en mg de peso fresco. Una vez determinado el peso fresco, las células se pesaron en filtros de papel Whatman y se colocaron en una estufa a 50 °C durante 48 h. Posteriormente, se determinó el peso seco de las células, expresando los resultados en mg de peso seco.

La caracterización de las curvas de crecimiento se realizó tomando como base los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial”, “volumen de empaquetamiento celular máximo” y “tiempo de agotamiento”, obtenidos a partir de los datos cinéticos de las curvas de crecimiento, como se indica a continuación:

- Velocidad de crecimiento en la fase exponencial (V_{exp}): se define como el incremento de biomasa en el intervalo de tiempo transcurrido durante la etapa lineal de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

$$V_{exp} = \Delta VEC / \Delta t$$

- Volumen de empaquetamiento celular máximo o biomasa máxima (VEC_{max}): es el umbral superior al que tiende el aumento de la biomasa.
- Tiempo de agotamiento (T_a): tiempo estimado a partir del cual, la escasez de nutrientes comenzaría a provocar estrés y muerte celular.

$$T_a = (VEC_{max} - VEC_{t_0}) / V_{exp}$$

siendo VEC_{t_0} , la biomasa inicial, si el cultivo se desarrollara en continuo crecimiento exponencial.

Adicionalmente, se determinó el índice de crecimiento de la biomasa (ICB) y la productividad de la biomasa (Pr) a partir de las ecuaciones descritas por Wu y Ho (1999):

$$ICB = \text{densidad celular máxima } (X_{max}) / \text{densidad celular inicial } (X_0)$$

$$Pr = (X_{max} - X_0) / \text{tiempo necesario para alcanzar la densidad celular máxima } (t)$$

IV. Elicitación de las suspensiones celulares

En todos los ensayos de elicitación, en primer lugar se procedió a la filtración de las células utilizando un embudo Büchner esmerilado con placa filtrante de borosilicato, de 40-90 μm de tamaño de poro, acoplado a un matraz kitasato. A continuación, se realizó un ligero vacío, utilizando para ello una bomba de membrana Laboport[®]. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar y utilizando material estéril. Una vez eliminado el medio de cultivo, se lavaron las células con medio de cultivo fresco y se volvió a aplicar vacío. A continuación, las células se pesaron y se añadieron a los matraces para realizar los diferentes tratamientos.

En todos los experimentos de elicitación, se utilizaron 20 g de PF de células en 100 mL de medio de cultivo utilizando como recipientes matraces de 250 mL de capacidad. Las suspensiones celulares se incubaron durante 96 horas con los elicitores y, transcurrido el periodo de incubación, se recogieron muestras para la determinación del VEC de cada tratamiento. A continuación, se separó el medio de cultivo de las células, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, en condiciones no asépticas. Las células se lavaron con agua fría, se filtraron realizando un ligero vacío y se pesaron. Asimismo, se midió el volumen de medio de cultivo recogido tras el tratamiento de elicitación. Finalmente, se hicieron alícuotas de las células y del medio extracelular y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

IV.1. Elicitación con CDs y/o MJ

Los experimentos de elicitación se llevaron a cabo con suspensiones celulares de tomate cv. MT en fase exponencial (crecidas durante 10 días). La elicitación de las suspensiones de tomate se realizó con dos ciclodextrinas sintéticas, ciclodextrinas metiladas al azar (CDsM) y ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar (CDsH), a una concentración de 50 mM. Asimismo, en los estudios de elicitación se empleó otro elicitor, el MJ a una concentración de 100 μM , ya que se ha comprobado que esta concentración es la óptima para inducir metabolitos en diferentes especies vegetales

(Lee-Parsons et al., 2005; Sánchez-Sampedro et al., 2005), incluyendo a *S. lycopersicum* cv. MT (Chen et al., 2006).

Estas concentraciones de CDs (50 mM) y MJ (100 μ M) se han probado en suspensiones celulares de distintas especies como *Vitis vinifera* (Bru et al., 2006), *Catharanthus roseus* (Almagro et al., 2011a) y *Capsicum annuum* (Sabater-Jara et al., 2010) y se ha comprobado que son las óptimas para la producción de metabolitos secundarios. Por dicho motivo, no se realizaron ensayos de optimización de la concentración de los elicitores.

Los ensayos de elicitación se realizaron al final de la fase exponencial (día 10), cuando cesa la actividad proliferativa y se produce una diferenciación bioquímica del cultivo. El periodo de incubación con los elicitores fue de 96 h, por ser éste un tiempo comúnmente descrito en la bibliografía (Bru et al., 2006; Almagro et al., 2011a; Sabater-Jara et al., 2010; Sabater-Jara y Pedreño, 2013; Belchí-Navarro et al., 2012 y 2013).

Las suspensiones celulares se elicitaron con CDs o MJ y en presencia de ambos elicitores, se realizaron seis tratamientos diferentes: control (suspensiones en ausencia de elicitores), 50 mM de CDsM, 50 mM CDsH, 100 μ M MJ, 50 mM CDsM + 100 μ M MJ y 50 mM CDsH + 100 μ M MJ. El MJ fue disuelto previamente en etanol, siendo la concentración final de etanol en los medios de cultivo inferior al 0.5%. La disolución de MJ se adicionó a los medios de cultivo una vez esterilizada mediante filtración, utilizando filtros estériles de 0,22 μ m (Millipore) y realizando el proceso en la cabina de flujo laminar (modelo KB/KBM).

La incubación con los elicitores se prolongó durante 96 h y los cultivos se mantuvieron con un régimen de 16 h luz por 8 h de oscuridad, a 25 °C en un agitador orbital (105 rpm).

V. Determinación de la viabilidad celular

V.1. Determinación de la viabilidad celular con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC)

La viabilidad en las suspensiones celulares se determinó mediante el ensayo de reducción del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC), que es reducido a formazano mediante la acción de NADH deshidrogenasas mitocondriales. El formazano (compuesto rojo e insoluble en agua) puede solubilizarse con etanol y medirse espectrofotométricamente a 485 nm. En la medida de viabilidad celular se empleó el método descrito por Zapata et al. (1991) con ligeras modificaciones. Para ello, a 1 mL de suspensión celular se le añadió 100 µL de TTC al 1 % (p/v) disuelto en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,4. La mezcla se incubó durante 24 horas en la oscuridad a 25 °C. Posteriormente, se procedió a la filtración de las células sobre un filtro de vidrio GF/A y éstas se resuspendieron en 1 mL de etanol al 95 % (v/v). Para la extracción del formazano, la mezcla se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Después de la extracción, las muestras se centrifugaron (10000 g, 5 min), usando una centrífuga eppendorf 5415R. A continuación, se procedió a la cuantificación de los niveles de formazano midiendo la absorbancia de los sobrenadantes a 485 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular en relación a la viabilidad celular del tratamiento control. La fórmula empleada fue:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (\text{Absorbancia células tratadas} / \text{Absorbancia control}) \times 100$$

Además, la viabilidad se comprobó al microscopio utilizando el mismo ensayo (reducción del TTC) siguiendo el protocolo descrito por Dixon (1985) con ligeras modificaciones. Para ello, a 1 mL de la suspensión celular se le añadió 10 mL de TTC al 1%, disuelto en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,4. La mezcla se incubó en la oscuridad durante 2 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se

centrifugaron (250 x g 5 min), se lavaron con agua destilada y, posteriormente, fueron observadas bajo microscopía de campo claro y fotografiadas con una cámara digital.

V.2. Determinación de la viabilidad celular con diacetato de fluoresceína (DAF)

Como marcador fluorescente, para estimar la viabilidad celular por observación microscópica, se utilizó el 3',6'-diacetato de fluoresceína (DAF), según el protocolo establecido por Huang et al. (1986). Cuando el fluoróforo penetra en la células, los grupos acetilo se hidrolizan por acción de las hidrolasas ligadas a la membrana plasmática (Stubberfield y Shaw, 1990) y por las esterasas citoplasmáticas (Steward et al., 1999). La fluoresceína queda libre, emitiendo fluorescencia verde a 520 nm cuando se ilumina con luz azul (490 nm). La disolución de ensayo se preparó diluyendo 20 µl de una solución de DAF (5 mg/ mL en acetona) en 980 µl del mismo medio de cultivo en el que habían sido cultivadas las células. La tinción de las células se llevó a cabo mezclando, en una relación 1:1, un volumen de suspensión celular con la disolución de ensayo. La observación y la adquisición de las imágenes microscópicas de cada muestra se completaron dentro de los 10 minutos siguientes a la mezcla de las células con la disolución de DAF.

VI. Extracción de metabolitos

VI.1. Extracción de metabolitos presentes en el medio extracelular de suspensiones celulares elicidadas y control

Para la extracción de metabolitos presentes en el medio extracelular, se empleó la metodología descrita por Sabater-Jara et al. (2010). En primer lugar, se realizó una partición de fases con acetato de etilo (1:1, v/v) y se adicionó al medio extracelular NaHCO₃ al 3% (p/v) y NaCl al 10% (p/v), con el fin de obtener una clara separación de fases. Transcurrida una hora, se recogió la fase orgánica y se realizó una segunda extracción de la fase acuosa durante 1 h. Pasado ese tiempo, se recogieron las fases orgánicas (acetato de etilo) y se evaporaron en un rotavapor a 40 °C, aplicando vacío. El

residuo seco resultante se resuspendió en 1 mL de metanol (grado HPLC). Finalmente, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de Teflón (PTFE) de 0.45 µm, y se almacenaron en alícuotas a -80 °C para su posterior análisis cromatográfico con HPLC-MS y CG-MS.

VI.2. Extracción de metabolitos intracelulares procedentes de suspensiones elicítadas y control

Para la extracción de metabolitos celulares se siguió el protocolo descrito por Moco et al. (2006b). En primer lugar, se procedió a la homogeneización de las células (previamente trituradas en N₂ líquido) en presencia de metanol al 70 % (1:2 p/v). El homogenado se incubó en oscuridad durante 24 horas a 4 °C y se centrifugó (14 000 x g, 20 min, 4 °C). Una parte del sobrenadante se hidrolizó en presencia de HCl 6 M durante 1 hora a 90 °C en oscuridad. Ambos extractos, hidrolizados y no hidrolizados, se filtraron a través de filtros de membrana de Teflón (PTFE) de 0.45 µm, y se almacenaron en alícuotas a -80 °C para su posterior análisis cromatográfico con HPLC-MS.

VII. Evaluación de metabolitos secundarios

VII.1. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios por cromatografía HPLC-MS y CG-MS

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el medio extracelular y en las células, tanto control como elicítadas, se utilizó un sistema cromatográfico HPLC Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography) modelo Alliance 2695, compuesto por un módulo de separación modelo 2695, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de fotodiodos modelo 2996. Los datos fueron procesados con el programa informático Waters Millennium 32.

La separación se realizó sobre una columna Phenomenex de fase reversa C18 (4,60 x 250 mm, 5 µm). La fase móvil empleada estaba constituida por un gradiente de ácido

fórmico 0,1 % en agua (disolvente A) y ácido fórmico 0,1 % en metanol/acetonitrilo (60/40, v/v) (disolvente B). El gradiente utilizado fue el siguiente: 90 % A y 10 % B, t=0 minutos; 65 % A y 35 % B, t=20 minutos; 60 % A y 40 % B, t=30 minutos; 35 % A y 65 % B, t=45 minutos; 35 % A y 65 % B, t=50 minutos; 90 % A y 10 % B, 55 minutos; 90 % A y 10 % B, 60 minutos. La velocidad de flujo se fijó en 1 mL/minuto y el volumen de inyección fue de 40 μ L.

La identificación de los compuestos fenólicos individuales se realizó comparando las propiedades espectrales y tiempos de retención de los picos mayoritarios de las muestras, con los estándares comerciales. Se utilizó ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cinámico, vainillina, resveratrol, rutina, y quercitina. La cuantificación de los compuestos fenólicos individuales se realizó inyectando diferentes concentraciones (0,25-100 μ M) de los estándares puros y construyendo la correspondiente recta patrón, teniendo en cuenta las áreas de los picos de los cromatogramas extraídos a 306 nm.

Para la identificación y cuantificación de los terpenoides presentes en el medio extracelular en muestras control y elicidadas, se utilizó un sistema cromatográfico Agilent Technologies 6890 Network GS System, equipado con un detector de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos se realizó sobre una columna capilar Agilent 19091 S-433 HP-5MS, con un flujo de 1,0 mL/ minuto de helio como gas portador. La temperatura del horno se programó desde 60 °C hasta 310 °C y el volumen de inyección fue de 0,8 μ L. El programa de análisis consistió en un inicio a 60 °C con subida hasta 310 °C, alcanzando una temperatura máxima de 350 °C. La identificación de los terpenoides se realizó comparando los espectros de masas y el tiempo de retención experimentales y los obtenidos a partir de un patrón externo comercial y de aquellos que aparecen en la librería NBS 75K. La cuantificación de los terpenoides se realizó inyectando diferentes concentraciones (0,05-0,200 mg/mL) de los patrones comerciales (fucosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol) y construyendo la correspondiente recta patrón.

VII.2. Estimación del contenido de fenoles solubles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La determinación de los fenoles totales se realizó tal y como se describe en López-Arnaldos et al. (2001). Para ello, a 50 μ L de extracto metanólico se le añadió 75 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en agua MilliQ), 0,5 mL de Na_2CO_3 al 2% y NaOH al 0,4%. Después de 30 minutos de incubación a 25 °C en la oscuridad, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Las medidas fueron realizadas por triplicado, frente a un blanco con metanol.

La recta de calibrado para la estimación de las concentraciones de compuestos fenólicos se realizó utilizando ácido clorogénico disuelto en metanol como estándar, empleando un rango de concentraciones comprendidas entre 10-150 μ M.

VIII. Determinaciones enzimáticas en el medio extracelular e intracelular

VIII.1. Extracción de proteínas intracelulares y extracelulares

El proceso de extracción de proteínas intracelulares llevado a cabo dependió del tipo de determinación enzimática. Así, para la determinación de la actividad peroxidasa se homogeneizaron las células (previamente congeladas en N_2 líquido) en un mortero, a 4 °C, con tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,8), que contenía fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM, MgCl_2 5 mM, ácido ascórbico 5 mM, y polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1% (p/p). Tras centrifugar el homogenado (35000 x g, 30 min, 4 °C), se procedió a la precipitación de las proteínas del sobrenadante con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al 95 %. Finalmente, los extractos se dializaron durante toda la noche, a 4 °C, frente a tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0. Una parte del extracto proteico dializado se almacenó a -80 °C para la realización posterior de ensayos cinéticos y el resto se concentró, mediante centrifugación (3000 x g, 40 min, 4 °C) con concentradores de membrana Centricon-10 (Amicon, Millipore), para la realización de los ensayos electroforéticos.

Para la determinación de la actividad fenil alanina amonio liasa (PAL), las células se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,8), que contenía etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA-Na) 1 mM, PMSF 1 mM, Triton X-100 al 0,1 % (p/v), DTT 5 mM y PVPP 0,5 % (p/p). Tras centrifugar el homogenado (14000 x g, 30 min, 4 °C), el sobrenadante resultante fue desalado mediante filtración en columna Sephadex G-25 (PD10, GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), previamente equilibrada en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), EDTA 1 mM y DTT 2 mM.

La extracción de las proteínas extracelulares se llevó a cabo de acuerdo con Sabater-Jara et al. (2010). Con el fin de eliminar las sales del medio extracelular, se prepararon alícuotas (10-20 mL) que se dializaron durante toda la noche, a 4 °C, frente a tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,0. A continuación se procedió a la precipitación de las proteínas extracelulares con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 95 % durante 45 min, a 4 °C. Seguidamente, las muestras se centrifugaron (35000 x g, 35 min, 4 °C) y el precipitado resultante se resuspendió en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0. Finalmente, los extractos se dializaron durante toda la noche, a 4 °C, frente al mismo tampón. Una parte del extracto proteico se almacenó a -80 °C para la realización de ensayos cinéticos y otra parte se concentró mediante centrifugación (3000 x g, 40 min, 4 °C) con concentradores de membrana Centricon-10 (Amicon, Millipore), para la realización de los ensayos electroforéticos.

VIII.2. Medida de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)

Los ensayos cinéticos y las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV modelo 1603. Las actividades enzimáticas se expresaron en katal (unidad que se define como la cantidad de enzima capaz de convertir un mol de sustrato en producto por segundo) por mg de proteínas (nkatal/mg de proteínas).

La actividad peroxidasa se determinó en un medio de reacción que contenía tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0, H_2O_2 1,0 mM y diversos sustratos 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) 0,33 mM, ácido cafeico 0,5 mM, y ácido clorogénico 0,5

mM. La reacción se inició mediante la adición del extracto enzimático, y los incrementos de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 652 nm, para la determinación del producto de oxidación del TMB y a 410 nm para los productos de oxidación de los ácidos cafeico y clorogénico. Los coeficientes de extinción utilizados para el cálculo de la actividad enzimática aparecen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Sustratos y coeficientes de extinción empleados para el cálculo de la actividad peroxidasa

Sustrato	Coefficiente de extinción molar	Referencia
3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)	$\epsilon_{652} = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Mika y Lüthje, 2003
ácido cafeico	$\epsilon_{410} = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Ali et al., 2006
ácido clorogénico	$\epsilon_{410} = 2,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Ali et al., 2006

VIII.3. Medida de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.24)

La actividad PAL se determinó de acuerdo con López-Orenes et al. (2013). Los medios de ensayo (0,6 mL) contenían tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,8) y *L*-fenilalanina 5 mM. La reacción enzimática se inició mediante la adición del extracto enzimático (0,3 mL). Posteriormente, se incubó a 37 °C durante dos horas, deteniéndose la reacción con 20 μL de HCl 8 M. Los medios se centrifugaron (14000 g, 10 min) con el fin de precipitar las proteínas desnaturalizadas. A continuación, se midió la absorbancia a 290 nm frente a un blanco, en el cual se añadió el extracto enzimático y el HCl (8 M) antes de la adición de la fenilalanina. La actividad PAL se expresó en nmoles de ácido *trans*-cinámico $\text{h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína, utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon_{290} = 9,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Olsen et al. 2008).

VIII.4. Medida de la actividad endoquitinasa (EC 3.2.1.14)

La actividad endoquitinasa se determinó de acuerdo con el protocolo descrito por Hou et al. (1998) ligeramente modificado. Los medios de ensayo (0,2 mL) contenían tampón acetato sódico 50 mM (pH 5,0) y glicol quitina (G-7753, Sigma) al 2% (p/v). La reacción enzimática se inició mediante la adición del extracto enzimático (0,1 mL).

Posteriormente, se incubó a 37 °C durante una hora, deteniéndose la reacción con 500 µL de la solución A (4,0 g Na₂CO₃, 1,6 g glicina y 45 mg CuSO₄.5H₂O disueltos en 100 mL de agua Milli-Q) y 500 µL de reactivo B (0,12 % [p/v] neocuproína-HCl). Tras agitar los medios de reacción en el vórtex, se procedió a su incubación (100 °C, 3 min). Finalmente, los medios de reacción se centrifugaron (14000 x g, 10 min) y, a continuación se midió la absorbancia a 450 nm frente a un blanco con la enzima desnaturalizada. La cantidad de azúcares reductores liberados se estimó a partir de una curva de calibrado empleando un rango de concentraciones de *N*-acetilglucosamina (NAcGlc) comprendido entre 5 y 50 µg mL⁻¹. La actividad endoquitinasa se expresó en µg NAcGlc min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

VIII.5. Medida de la actividad 1,3-β-glucanasa (EC 3.2.1.39)

La actividad 1,3-β-glucanasa se determinó de acuerdo con Derckel et al. (1999). Los medios de ensayo (500 µL) contenía tampón acetato sódico 100 mM (pH 5,0) y laminarina (L-9634, Sigma) 0,225 % (p/v). La reacción enzimática se inició mediante la adición del extracto enzimático (50 µL). Posteriormente, se incubó a 37 °C durante dos horas, deteniéndose la reacción con 500 µL de la solución A (4,0 g Na₂CO₃, 1,6 g glicina y 45 mg CuSO₄.5H₂O disueltos en 100 mL de agua Milli-Q) y 500 µL de reactivo B (0,12 % [p/v] neocuproína-HCl). Tras agitar los medios de reacción en el vórtex, se procedió a su incubación (100 °C, 3 min). Finalmente, los medios de reacción se centrifugaron (14000 x g, 10 min) y, a continuación se midió la absorbancia a 450 nm frente a un blanco con la enzima desnaturalizada. La cantidad de azúcares reductores liberados se estimó a partir de una curva de calibrado empleando un rango de concentraciones de glucosa comprendido entre 1 y 10 µg mL⁻¹. La actividad 1,3-β-glucanasa se expresó en µg glucosa min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

IX. Determinación de la concentración de proteína total utilizando el reactivo de Bradford

Para la medida de los niveles de proteína total, tanto extracelulares como intracelulares, se siguió el procedimiento del microensayo de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.) basado en el método colorimétrico de Bradford (1976). Este ensayo se basa en la rápida formación de un complejo azul brillante de Coomassie G250-proteína, muy estable, y con una absorción a 595 nm que hace el método muy sensible y permite la detección de proteínas en un rango de entre 1 y 20 µg/mL.

Las muestras y los estándares se diluyeron con agua Milli-Q (0,8 mL), disolución a la que se añadieron 0,2 mL del reactivo concentrado. Posteriormente, los medios de reacción se agitaron y después de 15 min de incubación se tomó lectura de la absorbancia a 595 nm. La conversión de los valores de absorbancia en mg de proteína fue realizada empleando una recta patrón de seroalbúmina bovina (5-25 µg BSA).

X. Determinaciones electroforéticas

X.1. Determinación del patrón isoenzimático mediante isoelectroenfoque analítico

Los ensayos electroforéticos se realizaron en un sistema MiniProtean III de BioRad (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Para la preparación de los geles de 1 mm de espesor, se añadieron en un balón de vacío anfolinas (Bio-Rad) de rango de pH 3,5-10 al 2,5 %, acrilamida: bisacrilamida (37,5:1) al 5 % y glicerol al 10 % en agua Milli-Q. El medio resultante se desgasificó durante 10 min y, a continuación, se adicionó persulfato amónico (0,1 g/mL) al 0,06 %. La disolución se vertió entre los cristales con ayuda de una pipeta y se dejó polimerizar durante 45 min a temperatura ambiente. Los extractos proteicos se diluyeron (1:1, v/v) con tampón de carga (2X) compuesto por glicerol al 47,6 %, anfolinas al 6 % y agua Milli-Q. El volumen de muestra cargado por calle fue de 30 µL. Asimismo, se utilizó citocromo c a una

concentración de 3 mg/ml, como proteína marcadora. Las disoluciones de electrodo utilizadas fueron ácido acético 20 mM para el ánodo e hidróxido sódico 25 mM para el cátodo. Los electrodos se conectaron a una fuente eléctrica (BioRad Powerpac 300) programable en dos etapas, en la primera se aplicó un voltaje de 200 V durante 90 min, y en la segunda, 400 V durante 90 min para el IEF en condiciones de equilibrio, o bien 15 min para el IEF en condiciones de no equilibrio. En ambos casos, la intensidad de corriente fue de 10 mA (1 mA por calle del gel) y la potencia máxima de 150 W. El desarrollo del IEF se realizó a 4 °C.

El revelado de los geles se realizó según el método empleado por Ferrer et al (1990). Tras equilibrar los geles en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5,0) durante 15 min, se adicionó 4-metoxi- α -naftol (1 mM) y H₂O₂ (0,5 mM). Transcurridos 20 min de reacción, los geles se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de reactivos. Para la adquisición de imágenes de los geles teñidos se empleó un escáner específico para geles (ImageScanner: Amersham Bioscience). En el análisis y el procesamiento de la imagen se utilizó el programa de procesamiento de imágenes ImageJ, desarrollado por el National Institute of Health (EE.UU.).

X.2. Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

En este tipo de electroforesis las proteínas se desnaturalizan por calor, se despliegan y el SDS se une a ellas neutralizando sus cargas y confiriéndoles carga negativa, de manera que se separan de acuerdo a su peso molecular.

En primer lugar se preparó el gel separador, compuesto por acrilamida/ bisacrilamida al 10 %, tampón Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) al 25 % y SDS al 0,1 %. La mezcla se desgasificó durante 15 min, tras los cuales se añadió persulfato amónico al 0,05 % y TEMED al 0,15 %. Posteriormente, el medio de polimerización se vertió entre los cristales del mismo sistema MiniProtean III de Bio-Rad utilizado para el IEF y se dejó polimerizar durante 45 min. Antes de comenzar la polimerización se añadió un poco de agua sobre el medio de polimerización para la obtención de un frente homogéneo.

El gel concentrador se preparó a partir de acrilamida/ bisacrilamida al 4 %, tampón Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) al 25 % y SDS al 0,1 %. Después de desgasificar durante 15 min, se añadió persulfato amónico al 0,08 % y TEMED al 0,2 %. Esta disolución se añadió sobre el gel separador polimerizado, eliminando previamente el agua que lo cubría y dejando polimerizar durante otros 45 min.

Los extractos proteicos se diluyeron (2:1, v/v) con tampón de carga (5X) compuesto por tampón Tris-HCl (60 mM, pH 6,8), glicerol al 25 %, SDS al 2 % y azul de bromofenol al 0,1 % y agua Milli-Q. Los muestras diluidas se desnaturalizaron por calentamiento en un baño a 100 °C durante 10 min. El volumen de muestra cargado por calle fue de 30 µL. Se cargaron 5 µg de extracto de proteínas por tratamiento.

Como marcador de peso molecular se utilizó un estándar comercial (Bio-Rad) compuesto por fosforilasa b (103 kDa), seroalbúmina (77 kDa), ovalbúmina (50 kDa), anhidrasa carbónica (34,3 kDa), inhibidor de tripsina de soja (28,8 kDa) y lisozima (20,7 kDa).

La migración del gel se realizó en tampón glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,8 y SDS al 10 %, aplicando una corriente de 200 V y 400 mA de intensidad durante 45 min con una fuente Bio-Rad (Bio-Rad Power-Pack 300) a temperatura ambiente.

Las proteínas se revelaron siguiendo el protocolo de Pharmacia (PlusOne Silver Staining Kit, Protein). Para ello, los geles se incubaron durante 30 min en una solución de fijación con etanol puro al 40 % y ácido acético glacial al 10 % en agua destilada. El siguiente paso fue la sensibilización en una disolución de etanol al 30 %, glutaraldehído al 0,125 %, tiosulfato sódico al 0,2 % y acetato sódico al 6,8 %. A continuación, los geles se lavaron 3 veces con agua destilada durante 5 min y se incubaron en una disolución que contenía nitrato de plata al 0,25 % y formaldehído al 0,015 % durante 20 min. Los geles se volvieron a lavar, 3 veces, con agua destilada y se revelaron con una disolución que contenía carbonato sódico al 2,5 % y formaldehído al 0,0074 %. Por último, tras detener la reacción con EDTA al 1,46 %, los geles fueron escaneados.

XI. Anál isis proteómico

XI.1. Microsecuenciación de bandas de proteínas del medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT

Los análisis proteómicos se realizaron en el Servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid.

Las bandas de interés del gel se recortaron manualmente, se depositaron en placas de 96 pocillos y se procesaron automáticamente en un Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para la digestión proteica (Shevchenko et al., 1996), las piezas del gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y se trataron con acetonitrilo. Las proteínas se redujeron con DDT 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM. La digestión de las proteínas se realizó con tripsina de cerdo modificada (Promega, Madison WI) a una concentración final de 15 ng/μL en bicarbonato amónico 25 mM durante 4 h a 37 °C. Los péptidos se eluyeron del gel con ácido trifluoroacético 0,5% en agua durante 30 min a 25 °C.

XI.1.1. Espectrometría de masas ESI

La ionización por electronebulización (Electrospray Ionization, ESI) genera una amplia colección de iones metaestables, fácilmente fragmentables, pero requiere una purificación previa de las muestras por cromatografía capilar de alta resolución (nano-HPLC). La confinación de los iones generados en una trampa iónica y su posterior fragmentación en una cámara de colisión, permite la obtención de información secuencial. Para ello, el primer paso consistió en una digestión de la muestra, la cual se disolvió en 180 μL de tampón de digestión compuesto por urea 8 M, bicarbonato de amonio 25 mM, DTT 10 mM. Una alícuota correspondiente a 5 μL de la muestra procesada se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se añadió yodoacetamida a una concentración final de 50 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min en oscuridad. La muestra se diluyó 5 veces con bicarbonato de amonio 25 mM y se le

añadió tripsina recombinante (Roche, Alemania) en una proporción 1:25, incubándose toda la noche a 37 °C.

Los péptidos trípticos resultantes se secaron y se disolvieron en tampón ESI (0,5% de ácido acético en agua). La cromatografía líquida del análisis ESI MS/MS se realizó de la siguiente manera: las fracciones se depositaron en una columna de fase reversa C18 de 100 mm x 100 µm I.D. (New Objective, Woburn, MA) y se fraccionaron en un sistema cromatográfico Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings, Países Bajos) con un gradiente lineal del 5-40 % de tampón ESI B (90 % de acetonitrilo, 0,5 % de ácido acético en agua) a 450 nl/min durante 90 min. Los péptidos eluidos de la columna se analizaron directamente en un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Los espectros de fragmentación MS/MS se obtuvieron mediante conmutación automática entre el modo MS y MS/MS usando exclusión dinámica.

Para la identificación de proteínas, los espectros LC-ESI-MS/MS se transfirieron a la interfaz Bio Tools 2.0 (de Bruker Daltonics) para buscar en la base de datos del NCBI nr usando el software Mascot (www.matrixscience.com; Matrix Science, Londres, Inglaterra). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como modificación fija debido al tratamiento con yodoacetamida, metioninas oxidadas como modificación variable, una tolerancia de masa peptídica de 0,5 Da y tolerancia de hasta un sitio de ruptura tríptica sin digerir. En todas las identificaciones proteicas, la probabilidad de puntuaciones fue superior a la mínima puntuación establecida como significativa con un valor p inferior a 0,05.

XII. Análisis estadísticos

El procesamiento y análisis de datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.) versión 19.0. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test HSD de Tukey con el fin de detectar diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$).

4. Resultados y Discusión

*I. Caracterización de las suspensiones
celulares de Solanum lycopersicum cv.
Micro-Tom*

I.1. Medida del crecimiento celular de suspensiones celulares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

La determinación del perfil de crecimiento se realizó en suspensiones celulares que habían sido subcultivadas sucesivamente durante 4 semanas (6 subcultivos), con el fin de determinar con exactitud la duración de las distintas fases del crecimiento. Para ello, se tomaron muestras periódicas desde el inicio de la suspensión celular hasta los 20 días de cultivo.

La curva de crecimiento de la suspensión celular fue típicamente sigmoideal (Figura 4.1), distinguiéndose tres fases: la fase de latencia o “lag”, que comprende desde el inicio del cultivo, con una densidad celular inicial del 25 % (medida como VEC, %), y que corresponde a 10 g PS L⁻¹ hasta el día 5, donde se alcanza un VEC del 35 %, que equivale a 14 g PS L⁻¹; la fase de crecimiento exponencial o “log”, que engloba desde el día 5 al día 10, donde se obtiene un VEC del 64 % que corresponde a 25,5 g PS L⁻¹ y, finalmente, la fase estacionaria, que abarcó desde el día 16 hasta el final del cultivo y en la que se obtiene un VEC próximo al 79 %, lo que equivale a unos 31,5 g PS L⁻¹.

Para la determinación de la fase “log” se realizó una regresión lineal de todos los intervalos posibles, siendo el que más se ajustaba a una recta, el que comprendía desde el día 5 al 10 ($R^2=0,995$). El comportamiento del crecimiento observado a partir del día 10 determinó la necesidad de subcultivo de la suspensión celular cada dos semanas.

Con el fin de caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares se midió, además, la conductividad y el pH del medio de cultivo de las suspensiones (Figura 4.1). Así, la conductividad del medio extracelular mostró una variación inversamente proporcional a la curva de crecimiento. La conductividad del medio está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio. Por tanto, cuando las células están en la fase de mayor actividad metabólica –la fase exponencial- consumen una mayor cantidad de nutrientes minerales, lo que provoca una reducción de sus niveles en el medio de cultivo y, por consiguiente, de la conductividad. Por el contrario, como resultado de la

reducción del metabolismo primario durante las fases de latencia y estacionaria, las variaciones de la conductividad disminuyen (Suresh et al., 2001).

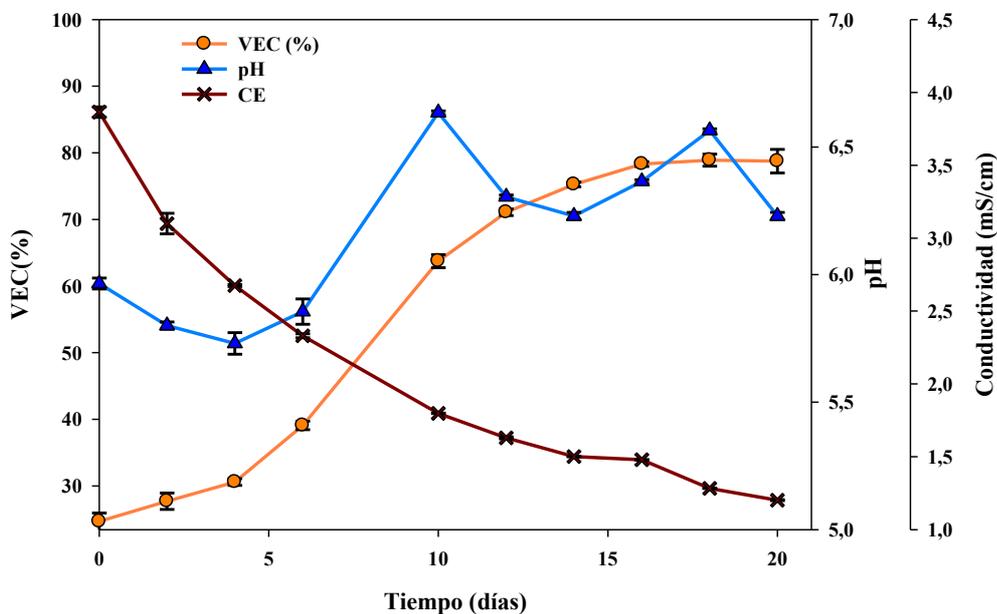


Figura 4.1. Curva de crecimiento de las suspensiones celulares de tomate cv. MT (—○—), y variaciones de pH (—▲—) y de la conductividad (—×—) en el medio extracelular durante el tiempo de cultivo. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar.

Por otra parte, el pH inicial del medio de cultivo fue $5,97 \pm 0,02$ y este valor aumentó durante el crecimiento hasta alcanzar un valor de $6,23 \pm 0,01$. La variación del pH está condicionada por el metabolismo celular que, en el caso de las células cultivadas *in vitro*, dependerá principalmente de la composición del medio de cultivo. El consumo de nutrientes y, concretamente, el consumo de las fuentes nitrogenadas modifican el pH del medio a lo largo del periodo de crecimiento. Las células vegetales cultivadas *in vitro* utilizan aquella fuente nitrogenada cuya incorporación implique un menor coste energético. Sin embargo, la incorporación de nitrógeno no sólo depende del coste energético para la planta, sino también de la relación de concentraciones de sales de amonio y de nitratos del medio de cultivo (Loulakakis y Roubelakis, 2001; Thorpe et al., 2008), y de la posibilidad, por parte de la célula, de reducir los nitratos y nitritos hasta amonio, lo cual está directamente relacionado con la utilización de la fuente carbonada para la obtención de energía.

I.2. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Para la determinación de los parámetros cinéticos sobre los que se ha basado la caracterización de la curva de crecimiento de *S. lycopersicum* se han utilizado las ecuaciones descritas en el apartado III de la sección “Materiales y Métodos”. Dichos parámetros se muestran representados en la Figura 4.2.

Los valores de estos parámetros cinéticos fueron $VEC_{\text{máx}}$ del 78,9 %, V_{exp} 5,5 ml de suspensión celular/día y T_a de 13 días (Figura 4.2). Estos resultados coinciden con los descritos en suspensiones celulares de otras especies vegetales cuando se emplean condiciones similares de cultivo (Sabater-Jara y Pedreño, 2013).

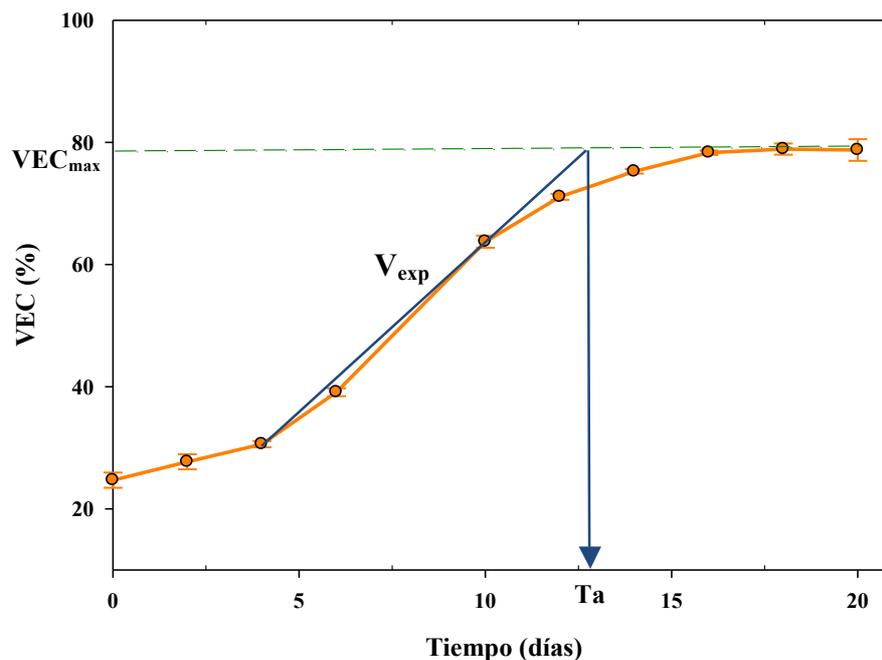


Figura 4.2. Representación de la curva de crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT utilizada para calcular los parámetros cinéticos. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar.

Además, se calcularon los índices de crecimiento y de productividad de biomasa (ver apartado III de la sección “Materiales y Métodos”). Los valores obtenidos fueron de 1,39 y de $0,83 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados son del mismo orden que los

observados en cultivos celulares de otras especies, como *Taxus chinensis*, en los que se determinaron unos índices de crecimiento y de productividad de biomasa de 2,6 y 0,85 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente (Wang et al., 2001).

I.3. Estudio la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de tomate cv. MT

I.3.1. Evolución de los niveles de compuestos fenólicos durante el crecimiento de suspensiones celulares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

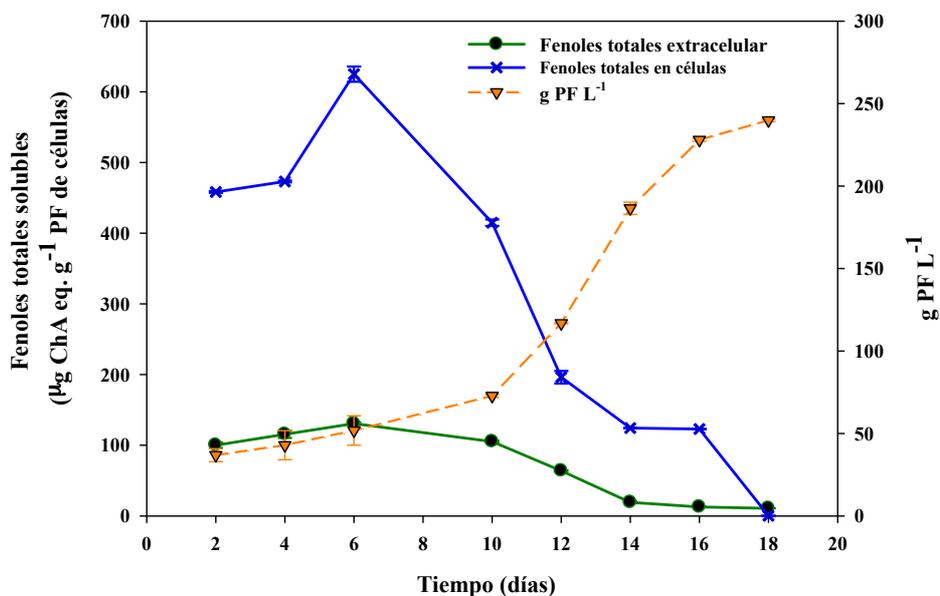


Figura 4.3. Evolución del contenido de fenoles solubles totales (expresado como μg equivalentes de ácido clorogénico por gramo de peso fresco de células) en células y en el medio extracelular durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar. La línea discontinua muestra la curva de crecimiento.

La Figura 4.3 muestra la evolución de los niveles de fenoles solubles totales durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT. Como se observa en dicha figura, el contenido de fenoles solubles en los extractos metanólicos obtenidos de células apenas varía en la fase de latencia ($458 \mu\text{g eq. clorogénico g}^{-1} \text{PF}$), alcanza un

valor máximo a los 6 d (625 $\mu\text{g eq. clorogénico g}^{-1}$ PF) seguido de un descenso continuado hasta el final del tiempo de cultivo estudiado (18 d). La concentración de fenoles solubles extracelulares también alcanza un valor máximo a los 6 d (131 $\mu\text{g eq. clorogénico g}^{-1}$ PF) y a continuación disminuye progresivamente hasta el día 14, donde se obtienen unos valores de 19 $\mu\text{g eq. clorogénico g}^{-1}$ PF que se mantienen hasta el final del cultivo.

Tras la determinación de los niveles de compuestos fenólicos solubles, se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), tanto en el medio intracelular como del extracelular. A partir de los datos del tiempo de retención y de los espectros de masas de los patrones comerciales y de aquellos señalados en la bibliografía (Martínez-Valverde et al., 2002; Mattila y Kumpulainen, 2002; Moco et al., 2006a y 2007) se pudo identificar dos ácidos hidroxicinámicos: el ácido cafeico ($\text{Tr}=15,12$ min) y el ácido *p*-cumárico ($\text{Tr}=19,74$ min). Las Figuras 4.4 y 4.5 muestran los cromatogramas y los espectros de masas de ambos compuestos.

La evolución del contenido de ácido cafeico en las células durante el cultivo se muestra en la Figura 4.6. Por su parte, los niveles registrados de ácido *p*-cumárico fueron muy bajos y en algunos puntos se encontraron por debajo del límite de cuantificación. *In planta*, se ha sugerido que la biosíntesis de fenilpropanoides ocurre mediante canalización metabólica (*metabolic channeling*), con lo que se favorece la síntesis de sustratos específicos y se evitan interferencias metabólicas. Así, Achnine et al. (2004) demostraron mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (*FRET*, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) que la PAL, la primera enzima citosólica de la ruta fenilpropanoide, se asocia con la siguiente enzima de la ruta, la cinamato 4-hidroxilasa, localizada en la membrana del RE. La formación de complejos multienzimáticos también se ha descrito durante la biosíntesis de otras familias de metabolitos secundarios, como isoprenoides, alcaloides, flavonoides, glucósidos cianogénicos, además de los fenilpropanoides (Jørgensen et al., 2005). Es posible que en las suspensiones celulares de tomate también se formen estos complejos multienzimáticos que podrían explicar una rápida conversión del ácido *p*-cumárico

(ácido 4-hidroxicinámico) en ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico). Las curvas que representan la evolución de los niveles de fenoles solubles totales y de ácido cafeico presentan un máximo a los 6 días de cultivo (Figuras 4.3 y 4.6, respectivamente). Sin embargo, la comparación de estas curvas sugiere que el ácido cafeico no fue el producto final de la ruta biosintética, ya que se acumuló a niveles muy inferiores a los determinados para los fenoles solubles totales.

El perfil de la evolución de los compuestos fenólicos mostrados en las Figuras 4.3 y 4.6 resulta inusual, ya que, generalmente, se ha descrito una relación inversa entre el crecimiento celular y la acumulación de fenoles, obteniéndose los máximos niveles de estos compuestos al final de la fase de latencia (ver por ej.: Sircar et al., 2007). Sin embargo, este mismo patrón se ha observado en cultivos celulares de fresa (López-Arnaldos et al., 2001). De hecho, existen varios trabajos que apuntan a que ciertos compuestos fenólicos pueden promover el crecimiento. Así, se ha comprobado que la aplicación de glucósidos derivados del alcohol coniferílico favorecen la división en cultivos celulares de tabaco (Teutonico et al., 1991; Tamagnone et al., 1998). Recientemente, mediante el uso de RNAi para bloquear la expresión del gen que codifica la enzima hidroxicinamoil CoA:siquimato hidroxicinamoil transferasa (HCT) y analizando mutantes deficientes en el gen *p*-cumaroil siquimato 3'-hidroxilasa (*ref8*), en el gen chalcona sintasa (*tt4-2*) y dobles mutantes (*ref8 tt4-2*) se ha demostrado que las rutas de biosíntesis aguas abajo del coniferilaldehído son esenciales para el crecimiento en plantas (Li et al., 2010).

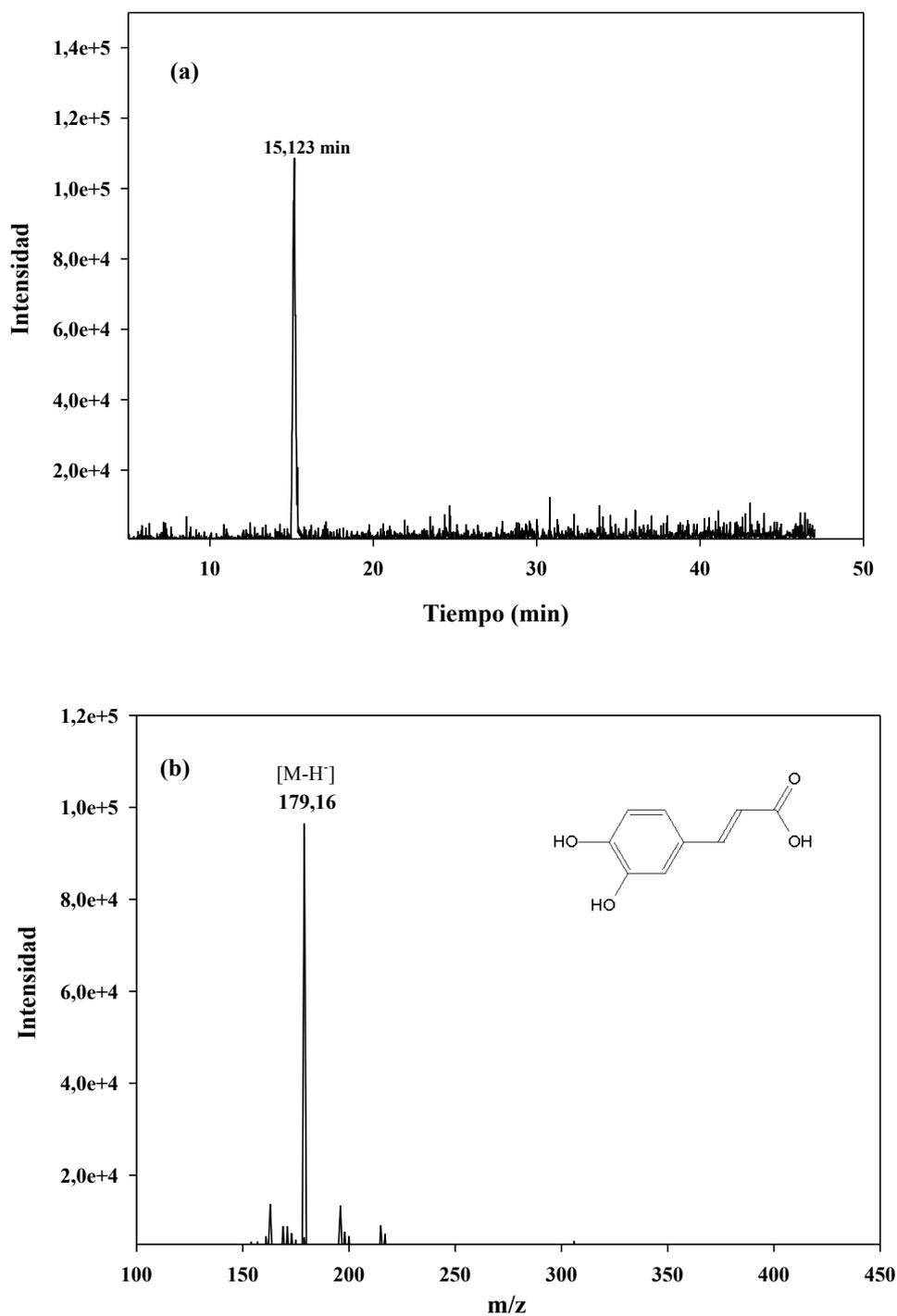


Figura 4.4. (a) Cromatograma extraído a partir de m/z 179,16 $[M-H]^-$, basado en HPLC-MS. (b) Espectro de masas y estructura química del ácido cafeico.

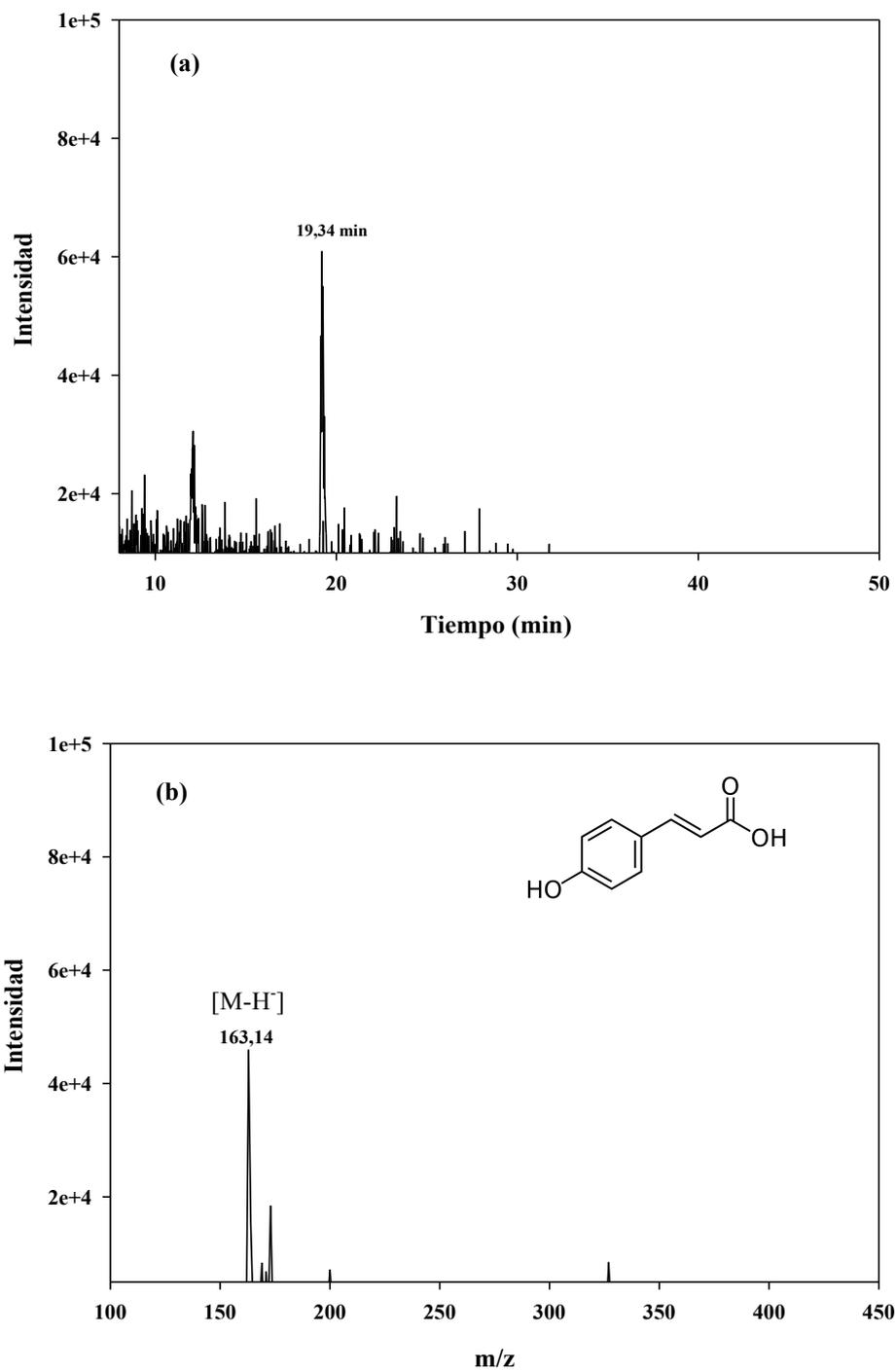


Figura 4.5. (a) Cromatograma extraído a partir de m/z 163,14 $[M-H]^-$, basado en HPLC-MS. (b) Espectro de masas y estructura química del ácido *p*-cumárico.

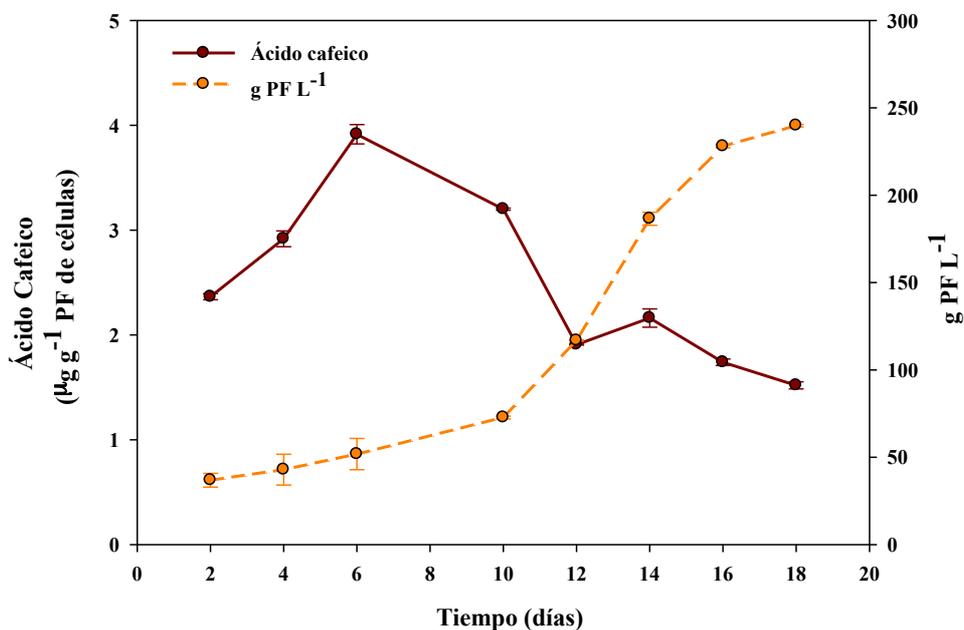


Figura 4.6. Crecimiento y evolución del contenido de ácido cafeico en células durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT, basado en HPLC-MS. Los valores representan el promedio de dos réplicas \pm error estándar. La línea discontinua muestra la curva de crecimiento.

1.3.2. Evolución de los niveles de terpenoides durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT

Con el fin de evaluar la evolución de los terpenoides en células y en el medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT, los extractos metanólicos fueron analizados por cromatografía CG-MS, tal y cómo se ha descrito en el apartado VII.1 de la sección de “Materiales y Métodos”. Siguiendo este procedimiento, en el cual la extracción se lleva a cabo con acetato de etilo, los niveles de estos compuestos de naturaleza terpénica no pudieron cuantificarse en las fracciones celulares por encontrarse por debajo, incluso, del límite de detección.

Los cromatogramas obtenidos a partir de los extractos extracelulares presentaron un gran número de compuestos, muchos de los cuales no pudieron ser identificados, a pesar de su abundancia, debido al escaso grado de fiabilidad o semejanza ($\geq 90\%$) que

presentaban cuando se comparaban con los espectros de masas de los patrones comerciales y los de la base de datos NBS 75K. No obstante, se pudieron identificar dos tipos de terpenoides: fitosteroles (isofucoesterol, Figura 4.7a, y β -sitosterol, Figura 4.7b) y un triterpenoide pentacíclico (taraxasterol, Figura 4.7c).

La evolución de los niveles de estos terpenoides durante el periodo de cultivo mostró ser aproximadamente la misma tanto para el β -sitosterol como para el taraxasterol (Figura 4.8), presentando un aumento progresivo en los niveles de ambos compuestos desde el día 2 hasta el día 10, que marca el final de la fase de crecimiento exponencial. Por el contrario, los niveles máximos del precursor del β -sitosterol, el isofucoesterol, se observan en el día 2 (fase lag) y disminuyeron gradualmente hasta el inicio de la fase estacionaria, donde se estabilizaron (Figura 4.8). Estos resultados coinciden con los descritos por Flores-Sánchez et al. (2002) y Kongduang et al. (2008) que, utilizando suspensiones celulares de *Uncaria tomentosa* y de *Croton stellatopilosus*, respectivamente, encontraron los máximos niveles de terpenoides durante la fase de crecimiento exponencial.

En plantas, se han identificado más de 200 tipos diferentes de fitosteroles (Posé et al., 2009), siendo los más abundantes β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, que representan entre el 95-98 % de todos los esteroides; aunque el principal esteroide presente en las membranas es el β -sitosterol (Piironen et al., 2000; Lagarda et al., 2006; Boutté y Grebe, 2009). Así, teniendo en cuenta que en los cultivos celulares de tomate cv. MT la mayor producción de β -sitosterol se observa al final de la fase de crecimiento exponencial (Figura 4.8), se puede sugerir que dicho incremento podría estar relacionado con los procesos de crecimiento celular que requieren la síntesis de nuevos compuestos de la membrana celular, entre otros, los fitoesteroides.

La identificación del taraxasterol en el medio extracelular (Figura 4.8) resulta sorprendente ya que este compuesto es muy común en la cutícula de los frutos del tomate (Wang et al., 2011) y en la bibliografía no se ha descrito su presencia en suspensiones celulares. En plantas cultivadas *in vitro*, se ha observado que la biosíntesis de taraxasterol requiere de cierto grado de diferenciación celular (Akashi et al., 1994).

En este sentido, cabe mencionar que las suspensiones celulares de tomate cv. MT tienden a formar agregados, lo que puede afectar a la diferenciación celular y, por lo tanto, a la inducción de la ruta de biosíntesis de taraxasterol.

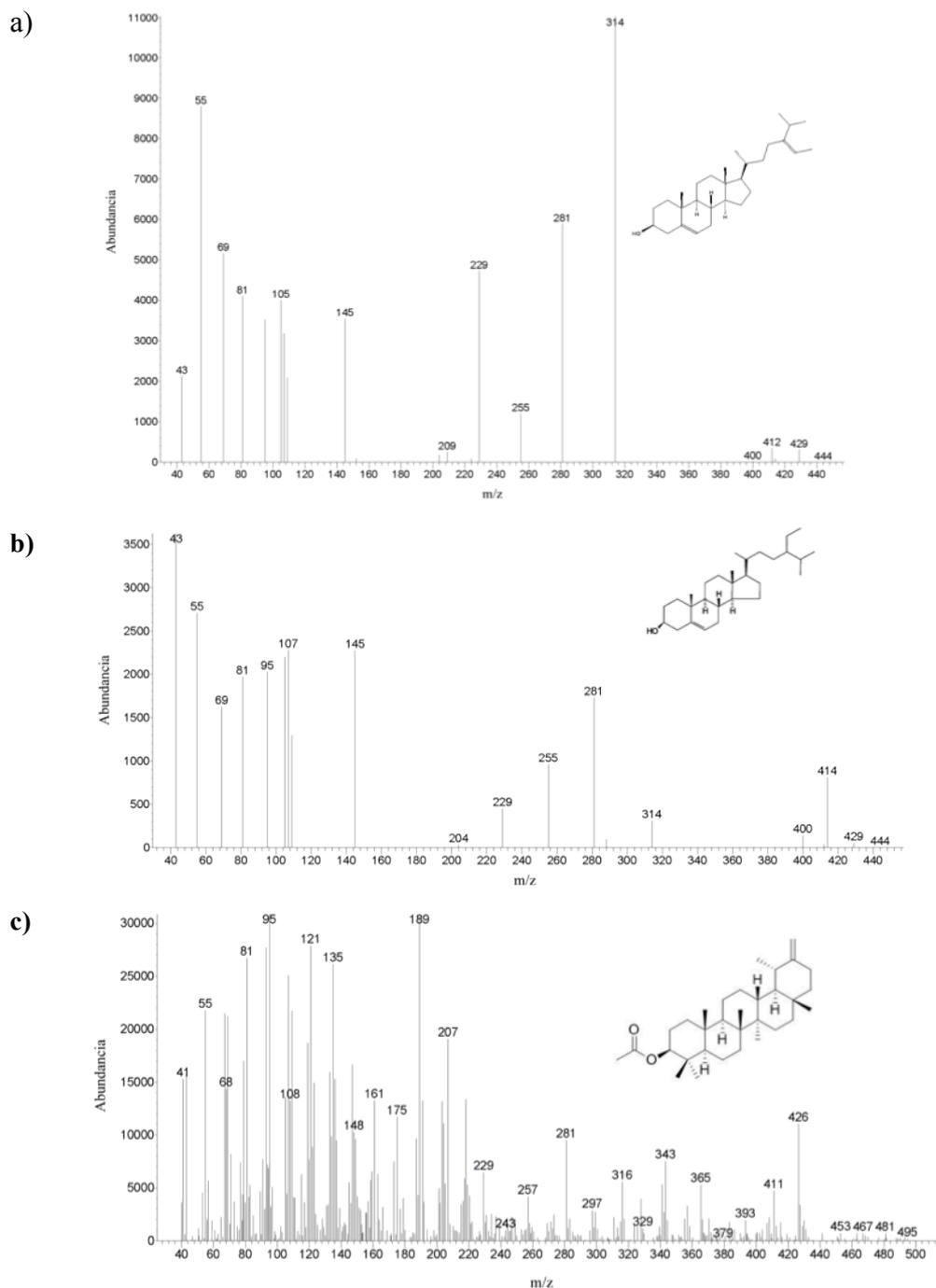


Figura 4.7. Espectro de masas y estructuras químicas del isofucosterol (a), β -sitosterol (b) y taraxasterol (c).

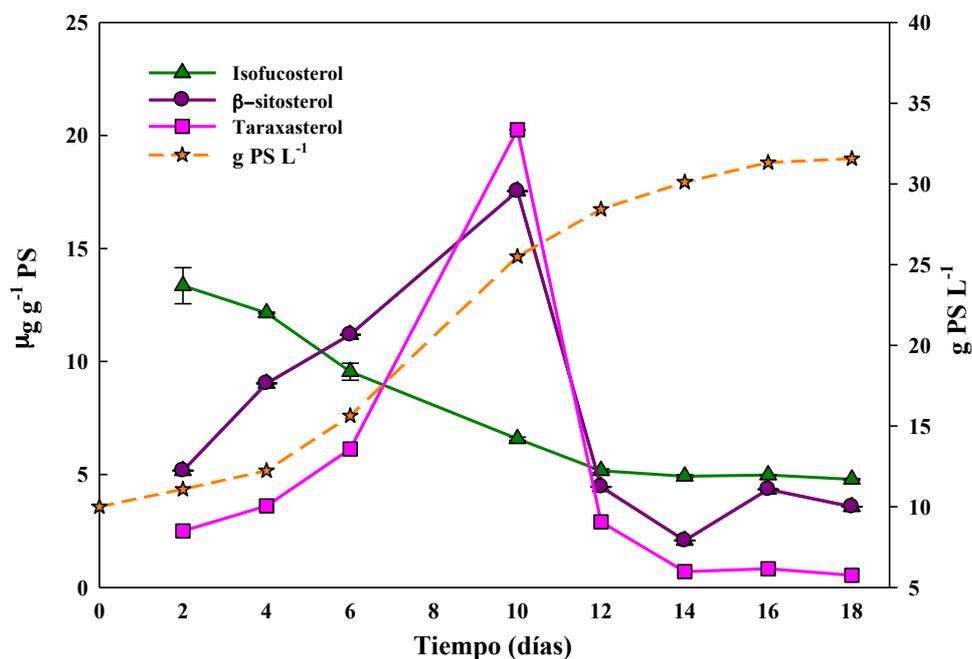


Figura 4.8. Crecimiento y evolución del contenido de fitosteroles en el medio extracelular durante el tiempo de cultivo de suspensiones celulares de tomate cv. MT, basado en CG-MS. Los valores representan el promedio de dos réplicas \pm error estándar. La línea discontinua muestra la curva de crecimiento.

1.4. Análisis de la expresión proteica durante el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT

1.4.1. Evolución del patrón de proteínas extracelulares e intracelulares totales en suspensiones celulares de tomate cv. MT

La evolución temporal de los patrones electroforéticos sobre geles de poliacrilamida, tanto en la fracción extracelular como en la intracelular, en condiciones desnaturizantes y reveladas posteriormente con tinción de plata, se muestra en las Figuras 4.9a y b. En la fracción extracelular (Figura 4.9a) se detectó una banda bien definida y con peso molecular aparente de, aproximadamente, 46 kDa a los 2 días de cultivo. En el día 4, el patrón electroforético es mucho más complejo y se observan 10

bandas con pesos moleculares aparentes comprendidos entre los 29 y los 50 kDa, 5 bandas de tamaño mayor de 50 kDa y 2 bandas de un tamaño comprendido entre 23 y 25 kDa (Figura 4.9a). En la fase activa de crecimiento, el perfil proteico es similar al observado en el día 4, aunque se detecta un mayor número de bandas de peso molecular aparente mayor de 50 kDa, así como un aumento en la intensidad de tinción de la banda de peso molecular próximo a 25 kDa. En la fase estacionaria (días 16 y 18) se detectan 4 bandas principales que presentan pesos moleculares aparentes comprendidos entre 34 y 46 kDa.

En relación con la fracción celular, cabe destacar la notable complejidad de los patrones electroforéticos desde el segundo día de cultivo (Figura 4.9b, calle 2), donde se puede apreciar un amplio grupo de bandas correspondiente a proteínas cuyos pesos moleculares aparentes están comprendidos entre los 103 kDa y los 21 kDa, aunque las bandas que presentan una mayor tinción son las que tienen un peso molecular aparente comprendido entre los 34 y los 46 kDa. Este patrón electroforético se mantiene durante el resto del cultivo, aunque en las fracciones correspondientes a las fases postexponencial (Figura 4.9b, calles 12 y 14) y estacionaria (Figura 4.9b, calles 16 y 18) no se observa tanta variabilidad en la intensidad de tinción entre las bandas.

Las peroxidasas vegetales de secreción son glicoproteínas cuyo peso molecular oscila entre 30 y 45 kDa (Almagro et al., 2009), rango en el que se incluyen algunas peroxidasas, entre las que se encuentran las isoenzimas del cacahuete (40 y 42 kDa, Chibbar et al., 1984), soya (38 y 45 kDa, Vianello et al., 1997), tomate (46 kDa, Jen et al., 1980), tabaco (36 kDa, Gazaryan y Lagrimini, 1996), aunque, en ocasiones, se han determinado pesos moleculares aparentes que quedan fuera de este intervalo, como es el caso de las peroxidasas del fruto de fresa (58,1 y 65,5 kDa, Civello et al., 1995), pimiento (59 kDa, Pomar et al., 1997), o de una isoenzima ácida de aguacate (60 kDa, Sánchez-Romero, 1995). En nuestro estudio se observa en el medio extracelular la presencia de bandas proteicas de un peso molecular aparente comprendido entre 34 y 46 kDa, que concuerda con los pesos moleculares de las peroxidasas de secreción anteriormente comentadas. Además, diversos autores han descrito la expresión constitutiva de las peroxidasas en el medio extracelular de cultivos celulares de *Zinnia*

elegans, *Cycas revoluta*, *Taxus baccata* (Novo Uzal et al., 2009). Por este motivo, la banda de 46 kDa (Figura 4.9a) podría corresponder a una isoforma de peroxidasa, debido a la proximidad de su peso molecular con el de otras isoformas descritas en la bibliografía.

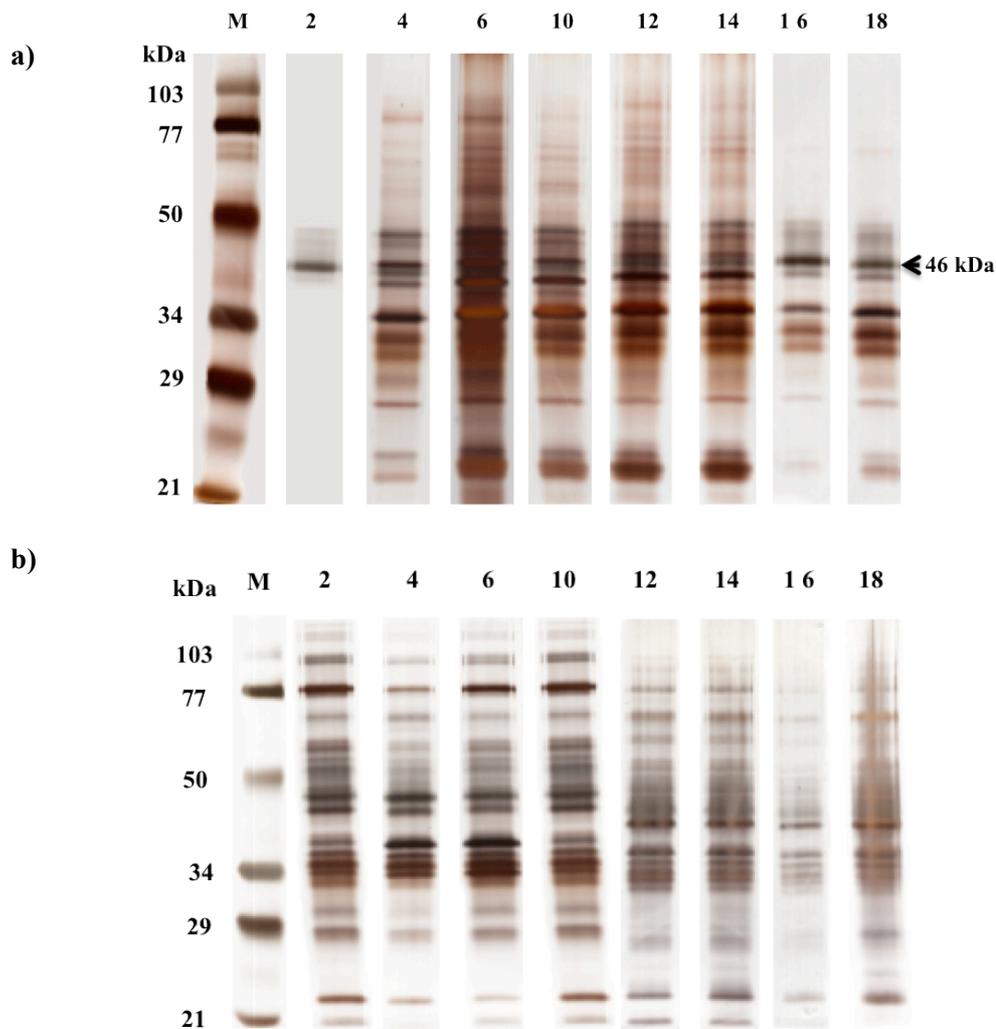


Figura 4.9. Evolución del patrón de proteínas totales del medio extracelular (a) e intracelular (b) de suspensiones celulares de tomate cv. MT durante el tiempo de cultivo, realizado mediante SDS-PAGE y revelado con nitrato de plata. Se cargaron 2 μ g proteína por calle. Marcadores de peso molecular (M). Las calles 2, 4, 6, 10, 12, 14, 16 y 18 indican días de cultivo.

Así mismo, la extensión de la glicosilación de esta enzima varía entre un 0 y un 25 %, siendo los principales azúcares que presentan la N-acetilglucosamina, la manosa, la

fucosa y la xilosa. La glicosilación es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidases vegetales de secreción (McEldoon y Dordick, 1996), ya que la eliminación de estos oligosacáridos, normalmente, afecta a la cinética de las peroxidases, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo a tripsina), su estructura secundaria y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero et al., 1994; Tams y Welinder, 1995; Duarte-Vázquez et al., 2003). De hecho, esta gran variabilidad en el patrón de glicosilación da lugar a isoformas con distintos pesos moleculares, por lo que las bandas de 49 y 56 kDa también podrían corresponderse con isoformas de peroxidasa con distinto grado de glicosilación.

En el medio celular, el patrón de bandas observado oscila entre los 103-21 kDa y, dada su complejidad, resulta difícil poder asignar una banda proteica concreta a una isoenzima de peroxidasa. En diferentes cultivares de tomate se han descrito pesos moleculares aparentes para distintas isoenzimas de peroxidasa extraída de frutos de 46 kDa (Jen et al., 1980), 40 kDa (Zia et al., 2001) y de 16,6, 40,0 y 42,0 kDa (Marangoni et al., 1989).

1.4.2. Evolución del patrón isoenzimático de peroxidases extracelulares e intracelulares en suspensiones celulares de tomate cv. MT

El análisis de los patrones electroforéticos, obtenidos mediante isoelectroenfoque, de las isoenzimas de peroxidasa presentes en los medios extra- e intracelular de las suspensiones, a lo largo del cultivo, mostró la presencia tanto de isoformas ácidas como básicas (Figura 4.10a y b).

Los patrones zimográficos del medio extracelular (Figura 4.10a) son bastante complejos, con la excepción del obtenido en el día 2. En este zimograma, que se corresponde con el inicio del cultivo, se observa la presencia de una isoenzima de pI muy ácido y de dos de pI ligeramente básico (pI en torno a 7,5-7,8). A partir del día 4, se observa la presencia de nuevas isoenzimas de peroxidasa que abarcan un amplio rango de pI, desde 4,0 a 8,3 (Figura 4.10a, calles 4-18) y con un patrón isoenzimático que, en términos generales, se mantiene similar hasta el día 18 del cultivo. Este

zimograma consta de una isoenzima de pI muy ácido (A1, de pI en torno a 4,0), dos de carácter ácido (A2 y A3), una isoenzima neutra (B1, pI en torno a 6,9), dos de pI ligeramente alcalino (B2 y B3, de pI en torno a 7,5-7,8), dos de carácter básico (B4 y B5) y una isoenzima fuertemente básica (B6, pI mayor de 8,5).

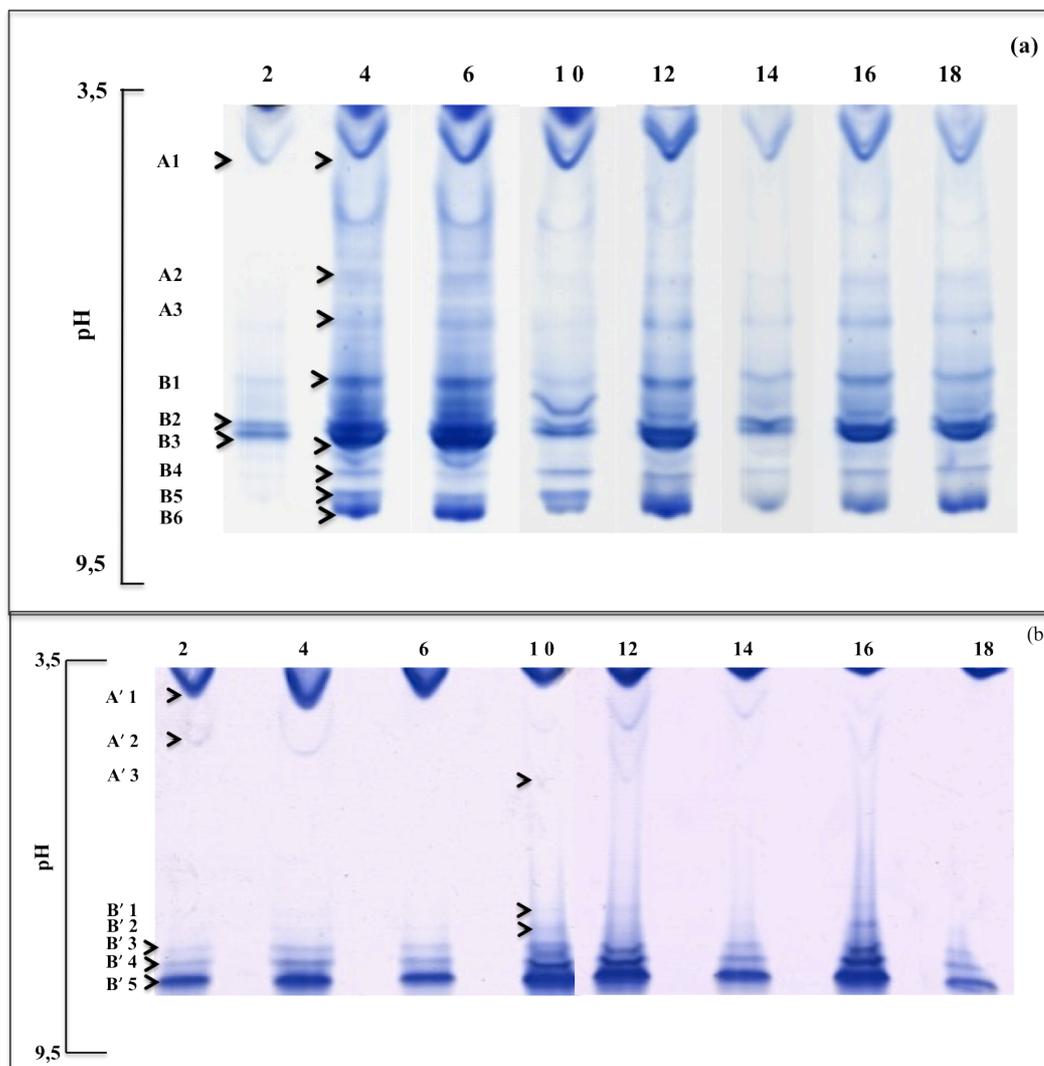


Figura 4.10. Evolución del patrón isoenzimático de peroxidasas, obtenidos mediante IEF y revelados con 4-MN y H_2O_2 , en el medio extracelular (a) e intracelular (b) de las suspensiones celulares de tomate cv. MT. Las calles 2, 4, 6, 10, 12, 14, 16 y 18 indican los días de cultivo.

En los extractos celulares, se observa que el patrón isoenzimático es bastante simple al inicio de la fase de latencia (Figura 4.10b, calles 2 y 4), éste consta de dos isoenzimas muy ácidas (pI en torno a 4,0-4,5; A'1 y A'2), dos de carácter básico (B'3 y B'4) y una

de carácter fuertemente básico (pI superior a 8,5; B'5). En el día 6 se observan las mismas isoenzimas básicas descritas en la fase de latencia, aunque no se detectan las isoenzimas de carácter ácido. Al final de la fase exponencial (día 10) se observa la presencia de nuevas isoenzimas de peroxidasa que abarcan un amplio rango de pI, desde 4,0 a 8,6 (Figura 4.10b, calles 10-16, A'3, B'1 y B'2) y este patrón isoenzimático se mantiene hasta el día 16 del cultivo. Este zimograma consta de dos isoenzimas de pI muy ácido (pI en torno a 4,0-4,5; A'1 y A'2), una de carácter ácido (pI en torno a 5,0; A'3), una isoenzima neutra (pI en torno a 6,9; B'1), una de pI ligeramente alcalino (pI en torno a 7,5; B'2), dos de carácter básico (pI en torno a 8,0-8,3; B'3 y B'4) y una isoenzima fuertemente básica, pI mayor 8,5 (B'5). Al final de la fase de estacionaria día 18 se observan sólo tres isoenzimas de carácter básico de pIs en torno a 8,0-8,5.

Estos resultados están de acuerdo con el ya clásico modelo de Gaspar et al. (1985), según el cual la expresión de isoenzimas específicas de la fase de prediferenciación preceden a la expresión de otras isoenzimas específicas de la fase inductiva, caracterizada por la aparición de cambios morfológicos y bioquímicos. La fase de iniciación se caracterizaría por un alto contenido de isoenzimas básicas, mientras que la fase de inducción vendría acompañada por un incremento en los niveles de peroxidasa ácidas. Estos resultados concuerdan con los señalados por otros autores que detectaron isoenzimas de naturaleza básica constitutivas en los medios de cultivo celulares, siendo sus pIs próximos a 8,2 (Calderón et al., 1992a y b; Ros Barceló et al., 2003; Bru et al., 2006).

Aunque en este estudio no se han comparado las poblaciones de isoenzimas de la peroxidasa entre las suspensiones celulares y los frutos, en la bibliografía se ha descrito que las isoperoxidasa en frutos de tomate presentan un amplio rango de pI (Heidrich et al., 1983), lo que está en consonancia con lo observado en este estudio. Patrones isoenzimáticos de peroxidasa similares entre frutos y cultivos celulares derivados de ellos se han descrito en fresa (López-Arnaldos et al. 2002) y en vid (Calderón et al., 1995), por ejemplo.

1.4.3. Evolución de la actividad peroxidasa soluble en el medio extracelular y en células de suspensiones celulares de tomate cv. MT

La evolución de la actividad peroxidasa soluble (expresada como $\text{nkat mg proteína}^{-1}$) a lo largo del ciclo de cultivo, tanto en el medio extracelular como en el celular, se determinó utilizando un sustrato sintético ampliamente utilizado, la tetrametilbencidina (Ros Barceló, 1998; Lucena et al., 2003; López-Serrano et al., 2004; López-Orenes et al., 2013), y dos sustratos naturales, el ácido clorogénico y el ácido cafeico, dos compuestos muy abundantes en frutos de tomate (Martínez-Valverde et al., 2002; Moco et al., 2006a y 2007; Iijima et al., 2008a; Sliemstad y Verheul, 2009). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.11. Los niveles de actividad peroxidasa se mantuvieron relativamente bajos cuando se utilizó ácido cafeico como sustrato, tanto en la fracción extracelular como en la celular, durante todo el periodo de cultivo, registrándose unos valores de actividad que oscilaron entre 1378 y 1910 nkat mg^{-1} proteína en el medio extracelular y en las células, respectivamente. Por su parte, en la Figura 4.11 también se observa que los extractos enzimáticos fueron capaces de oxidar en mayor extensión al ácido clorogénico, aunque el perfil de actividad varió entre las fracciones extracelulares y celulares. Así, en la fracción extracelular se observó que la actividad peroxidasa determinada con este sustrato aumentó durante la fase de latencia (días 2 y 4) hasta alcanzar su máximo, $16570,73 \pm 97,23 \text{ nkat mg proteína}^{-1}$ en la fase exponencial (días 6 y 10); a continuación la actividad cayó bruscamente al inicio de la fase postexponencial (día 12), registrándose un valor de actividad de $4922,64 \pm 17,55 \text{ nkat mg proteína}^{-1}$, valor que se mantuvo durante el resto del ciclo de cultivo. En la fracción celular, la actividad máxima se observó a los 6 días de cultivo, $17371,10 \pm 272,09 \text{ nkat mg proteína}^{-1}$, y los valores de actividad en las fases de latencia, postexponencial y estacionaria oscilaron alrededor de $5661,08 \pm 105,93 \text{ nkat mg proteína}^{-1}$. El perfil de actividad enzimática cuando se empleó TMB como sustrato fue similar tanto en el medio extracelular como en el celular (Figura 4.11a y b), obteniéndose el máximo de actividad en el día 6 de cultivo. El TMB fue el sustrato con el que se registraron los mayores niveles de actividad peroxidasa, hecho que ha sido ampliamente descrito en la bibliografía (Bestwick et al., 1998; López-Arnaldos et al., 2002; Mika y Lüthje 2003; López-Orenes et al., 2013).

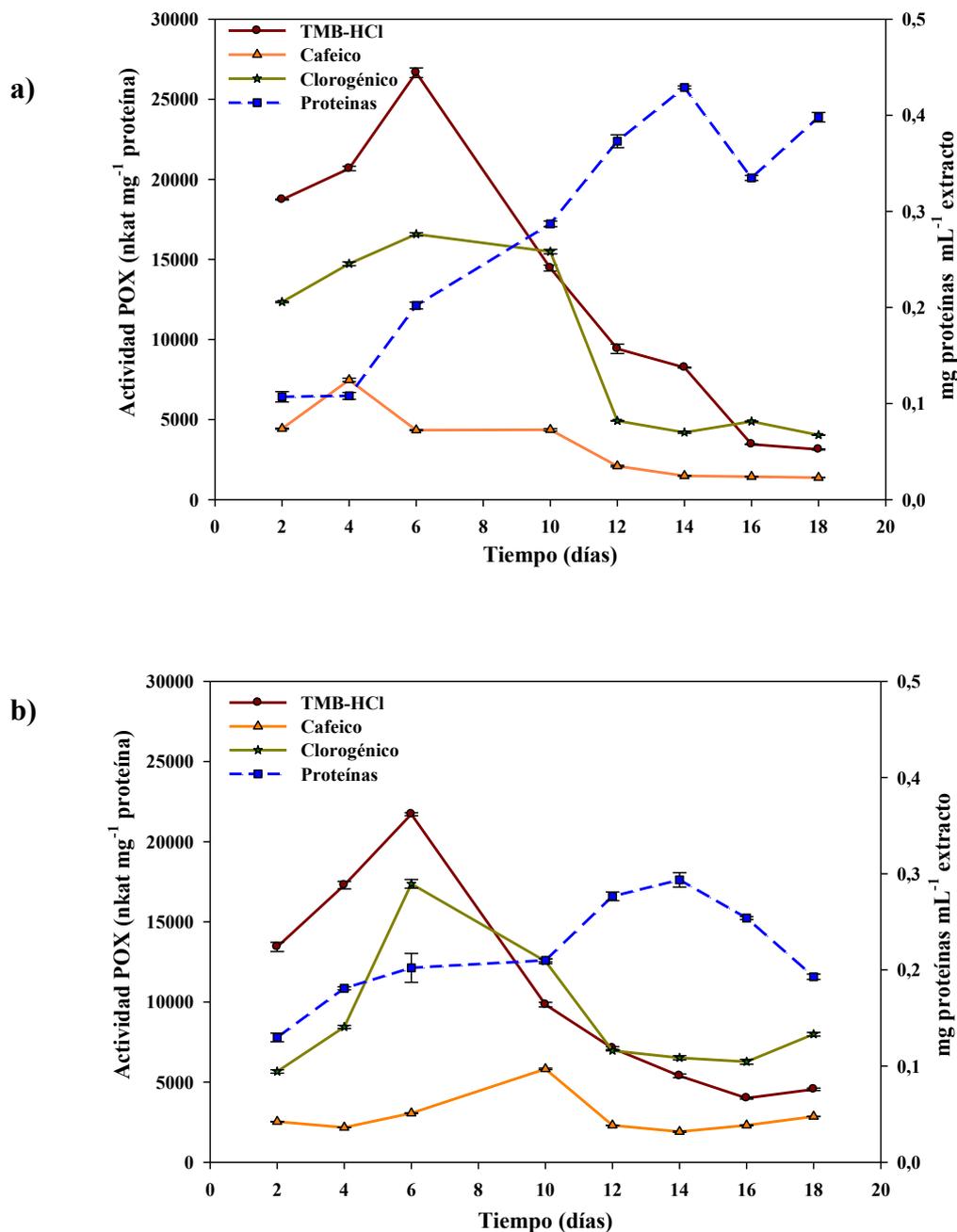


Figura 4.11. Evolución temporal de la actividad peroxidasa en el medio extracelular (a) e intracelular (b) de las suspensiones celulares de tomate cv. MT, usando como sustratos tetrametilbencidina, ácido cafeico y ácido clorogénico. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar. La línea discontinua azul muestra los niveles de proteínas.

No obstante, independientemente del sustrato empleado se observa que los mayores niveles de actividad peroxidasa coinciden con la fase de crecimiento activo. Resultados similares han sido descritos en cultivos celulares de fresa (López-Arnaldos et al., 2002) y en el hipocotilo de calabacín (Dunand et al., 2003), en los que se ha observado una correlación positiva entre los niveles de actividad peroxidasa (López-Arnaldos et al., 2002) y de transcritos (Dunand et al., 2003) con la tasa de crecimiento. Estos resultados sugieren que las peroxidasas pueden ejercer un efecto regulador, directo o indirecto, sobre la velocidad de crecimiento celular. Así, las peroxidasas pueden estimular los procesos de elongación celular, bien mediante la generación de radicales hidroxilo durante el ciclo hidroxílico, o bien controlando los niveles de peróxido de hidrógeno en el apoplasto (Passardi et al., 2005).

Además, hay que tener en cuenta que las peroxidasas pueden también inhibir la elongación celular mediante la formación de entrecruzamientos fenólicos entre polímeros matriciales (Passardi et al., 2005; Almagro et al., 2009), lo que podría explicar los resultados que describen una relación inversa entre tasa de crecimiento y actividad peroxidasa (Lagrimini et al., 1997; Córdoba-Pedregosa et al., 2005). En cualquier caso, dado el elevado polimorfismo enzimático de la peroxidasa en las suspensiones celulares de tomate cv. MT (ver Figura 4.10) es difícil establecer relaciones entre los niveles de actividad total y determinados procesos fisiológicos.

La comparación de las Figuras 4.11, 4.3 y 4.6 muestra que la actividad peroxidasa soluble específica determinada con TMB presentó un perfil similar al observado con los fenoles solubles totales (Figura 4.3) y con el ácido cafeico (Figura 4.6). El metabolismo de los compuestos fenólicos está regulado por la actividad de varias enzimas, como la PAL, enzima clave que cataliza la primera etapa necesaria para la síntesis de los fenilpropanoides, y aquellas enzimas implicadas en la oxidación de los compuestos fenólicos a quinonas, como la polifenoloxidasas y las peroxidasas. En cultivos de raíces en cabellera de zanahoria se ha observado que niveles elevados de compuestos fenólicos intracelulares provocan un aumento de la actividad peroxidasa (Kim y Yoo, 1996). Asimismo se ha descrito un patrón similar entre la evolución del contenido en fenoles solubles totales y la actividad peroxidasa específica en cultivos celulares de fresa, si

bien existe un cierto periodo de retardo de la segunda con respecto al primero en los puntos significativos de la curva (López-Arnaldos et al., 2002).

II. Análisis de metabolitos en cultivos celulares de tomate (Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom) elicitados con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas

II.1. Efecto del jasmonato de metilo y ciclodextrinas, por separado o en combinación, sobre el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT

Con el fin de determinar el efecto que producen los elicitors sobre el crecimiento celular, se midió el peso fresco de las células durante los tratamientos con CDs y MJ, separadamente o en combinación, de acuerdo con lo descrito previamente en el apartado III del Capítulo “Materiales y Métodos”. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.12. En dicha figura se observa que tras un periodo de incubación de 96 h, el MJ, a una concentración de 100 μM , provocó una reducción del crecimiento de un 26,5 % con respecto al control. En los tratamientos con ciclodextrinas metiladas al azar (CDsM) o hidroxipropiladas al azar (CDsH), solas o combinadas con MJ, la disminución del crecimiento fue inferior al 20 %.

Asimismo se procedió a la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del TTC (ver el apartado V del Capítulo “Materiales y Métodos”). En la Figura 4.13a se observa que los tratamientos con MJ provocaron un ligero descenso de la viabilidad celular (un 5,3 %), mientras que en los tratamientos con CDsM y con CDsH la disminución de la viabilidad celular fue de un 8 %. Por último, en los tratamientos combinados de ciclodextrinas y MJ es donde se observó una mayor reducción de la viabilidad celular, aunque en ningún caso superó el 11 %.

Los resultados sobre viabilidad celular obtenidos por espectrofotometría se corroboraron mediante la observación de las células al microscopio, utilizando dos ensayos: el del diacetato de fluoresceína (DAF) y el de reducción del TTC. En la Figura 4.13b (izquierda) se observa una imagen representativa de células elicitoradas incubadas con DAF, en la que se aprecia la emisión característica a 520 nm de la fluoresceína formada por la acción de hidrolasas de membrana (Stubberfield y Shaw, 1990) y esterasas citoplásmicas (Steward et al., 1999) sobre el DAF. La emisión de fluorescencia por las células se concentra, principalmente, alrededor de la membrana plasmática y en los anillos de división celular, lo que sugiere que se mantuvo la integridad de la membrana plasmática en la mayor parte de las células después de los

tratamientos de elicitación. En cuanto al segundo ensayo microscópico de la viabilidad, a la derecha de la Figura 4.13b puede verse la presencia de precipitados rojizos en el interior de las células de todos los tratamientos debido a la reducción del TTC a su correspondiente sal de formazano por la acción de las NADH deshidrogenasas mitocondriales. Estos precipitados se observaron tanto en los tratamientos control como en los elicitados, lo que sugiere que la reducción de la viabilidad celular tras la adición de elicitores no se debe a un aumento de la lisis celular.

La reducción del crecimiento celular tras el tratamiento con elicitores se ha observado en cultivos celulares procedentes de especies vegetales de origen taxonómico muy diverso, como *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 (Goossens et al., 2003), *Arabidopsis thaliana* (Pauwels et al., 2008), *Silybum marianum* (Belchí-Navarro et al., 2011), *Vitis vinifera* (Tassoni et al., 2005; Lijavetzky et al., 2008; Belchí-Navarro et al., 2012), *Capsicum annuum* (Sabater-Jara et al., 2010), *Mentha piperita* (Krzyzanowska et al., 2012), *Daucus carota* (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). En contraste con estos resultados, Durante et al. (2011) observaron en cultivos celulares de *Artemisia annua* que los tratamientos con 100 μ M de MJ solo o combinados con 50 mM de CDsM (DIMEB) o con CDsH (HYPRO) no modificaban ni el crecimiento ni la viabilidad celular.

Esta reducción del crecimiento tras la aplicación de elicitores puede ser debida a que estos compuestos favorecen la activación del metabolismo secundario sobre el primario y, en consecuencia, se produce una desviación del flujo metabólico (distribución del carbono) hacia la síntesis de metabolitos secundarios y, por tanto, se reduce la biomasa celular (Larronde et al., 2003; Sivakumar y Paek, 2005). Asimismo se ha sugerido que la aplicación exógena de MJ (100 μ M) disminuye la progresión del ciclo celular, ya que reprime la activación de los genes en la fase M, deteniendo el ciclo celular en la fase G2 (Pauwels et al., 2008).

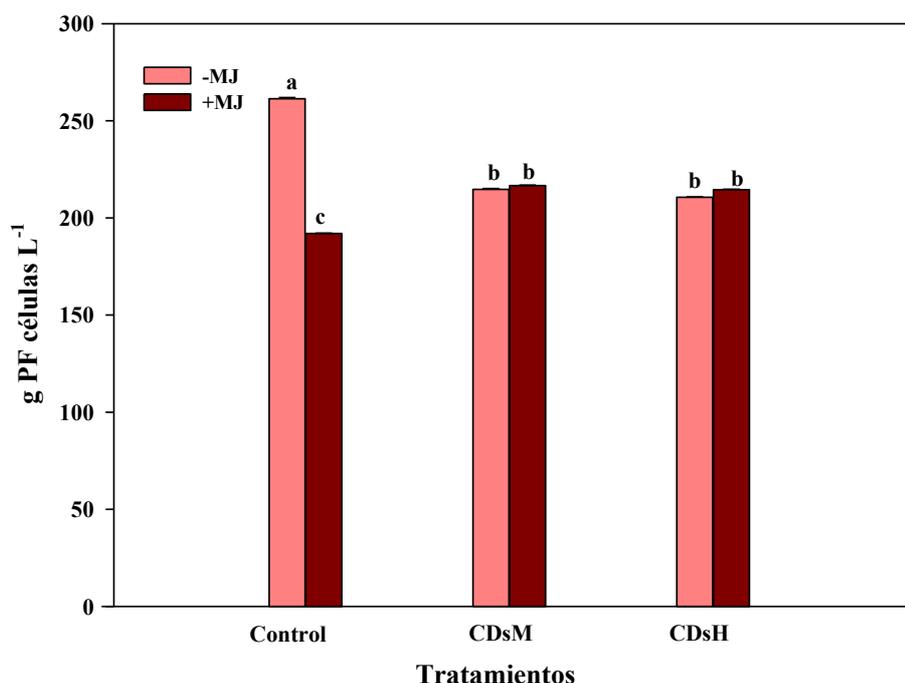


Figura 4.12. Efecto de la adición de MJ (100 μ M) sobre el crecimiento de suspensiones celulares de tomate cv. MT en presencia y ausencia de 50 mM de CDsM y CDsH. Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representados son las medias \pm SD de tres experimentos independientes. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

En relación con la pérdida de la viabilidad celular tras la adición de elicitores, estudios realizados por Kim et al. (2005) en cultivos celulares de *Taxus canadensis* y *T. cuspidata* han puesto de manifiesto que la pérdida de viabilidad tras la adición de 100 μ M MJ no se debe a un proceso de apoptosis, estimado mediante análisis de ADN, sino que está relacionado con un elevado incremento de los niveles intracelulares de taxol y de otros taxanos relacionados. Este mismo hecho, es decir altos niveles de taxol, se ha relacionado con la muerte celular en cultivos celulares de *T. chinensis* (Ma et al., 2002) y *T. baccata* (Expósito et al., 2009) y ha sido corroborado en *T. cuspidata* tras la adición de MJ (Yuan et al., 2002) o de otros elicitores como ácido salicílico y H₂O₂ (Qiao et al., 2003). Por lo tanto, teniendo en cuenta lo anterior, la disminución de la viabilidad observada en los cultivos de tomate MT podría deberse a la acumulación de determinados metabolitos secundarios en respuesta al tratamiento con MJ.

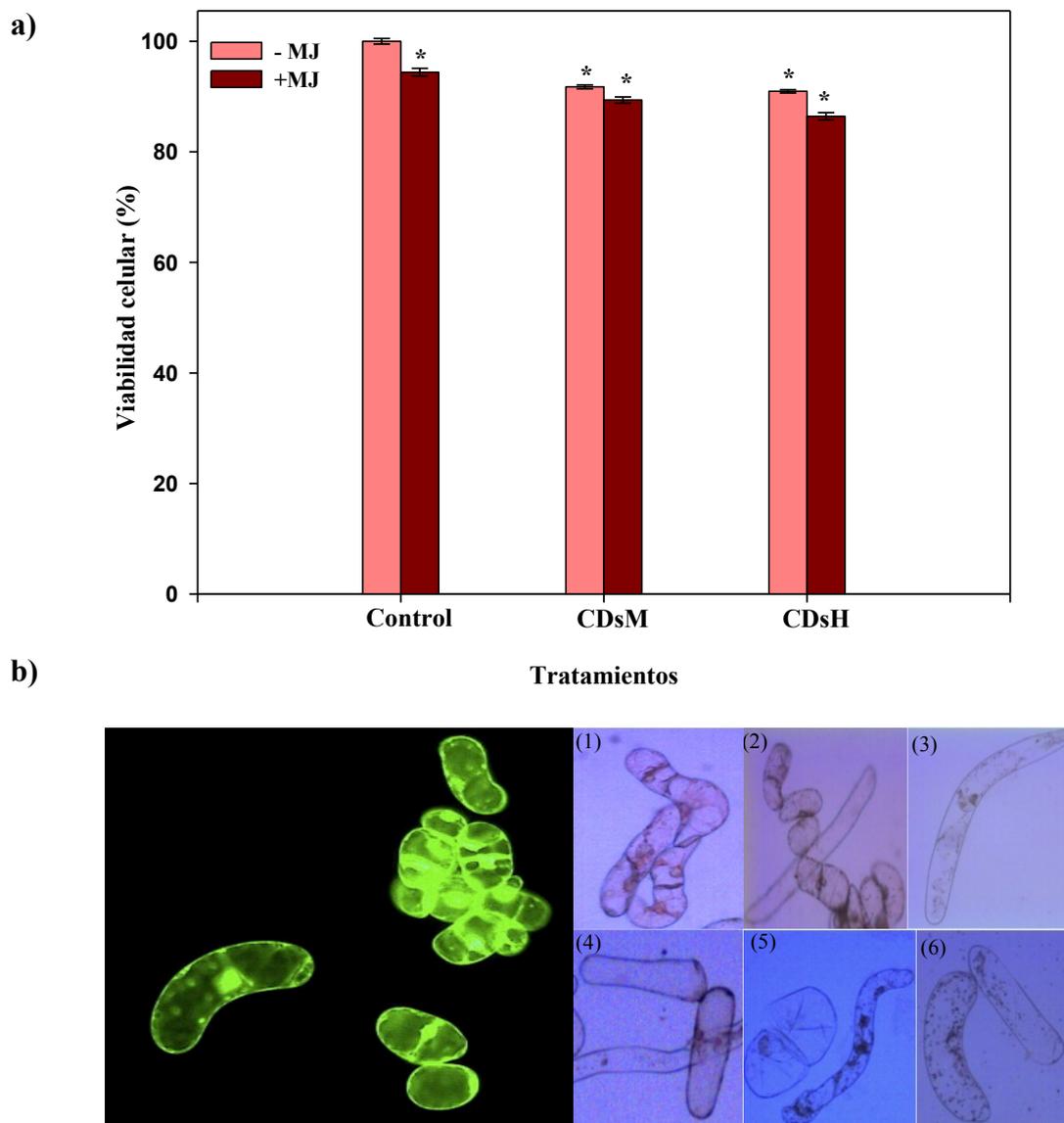


Figura 4.13. (a) Efecto de los adición de 100 μ M de MJ separadamente o en combinación con 50 mM de CDsM o con 50 mM CDsH sobre la viabilidad celular de suspensiones celulares de tomate cv. MT. Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representados son las medias \pm SD de tres experimentos independientes. Las barras con el signo “*” indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$). (b) Ensayos de viabilidad con DAF (izquierda) y con TTC al 1%, observadas por fluorescencia (DAF) y por microscopía de campo claro (TTC). Los números de las imágenes de la derecha indican los tratamientos: 1 (control), 2 (CDsM), 3(CDsH), 4 (MJ), 5 (CDsM+MJ) y 6 (CDsH+MJ), 100x.

II.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre la producción de terpenoides en suspensiones celulares de tomate cv. MT

Tras la elicitación de las suspensiones celulares con 100 μM de MJ y 50 mM de CDs, separadamente o en combinación, se realizó la extracción de los compuestos terpénicos presentes en el medio extracelular e intracelular (ver apartado VII.1 en el Capítulo “Materiales y Métodos”). Estos compuestos de naturaleza terpénica sólo se pudieron detectar y cuantificar en los medios extracelulares (Figura 4.14).

En la Figura 4.15, se puede observar que la adición de los distintos elicitores provocó un incremento en los niveles de isofucosterol, β -sitosterol y taraxasterol en el medio extracelular, aunque se observaron diferencias significativas en la producción de los distintos terpenoides en función del tratamiento aplicado. Así, los mayores cambios en la producción de terpenoides se observaron en las suspensiones tratadas con 50 mM de CDsM, en las que se apreció un incremento sustancial en la producción de isofucosterol (4,6 veces superior al tratamiento control) y taraxasterol (10,5 veces superior al control), aunque los tratamientos con CDsM provocaron un moderado incremento en la producción de β -sitosterol (1,7 veces superior al control).

La acumulación de isofucosterol y β -sitosterol fue similar en las suspensiones tratadas sólo con CDsM o con CDsM en combinación con MJ. Sin embargo, los niveles de taraxasterol fueron mayores en los tratamientos con CDsM (219 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS) que en los tratamientos combinados (CDsM+MJ; 180 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS). Asimismo se puede observar en la Figura 4.15 que los tratamientos con MJ provocan un moderado incremento en la producción de isofucosterol (3,5 veces superior al control, lo que equivale a 22,29 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS), pero la producción de β -sitosterol y de taraxasterol fue similar a los tratamientos control.

En relación con los tratamientos con CDsH, se observa que la acumulación de isofucosterol, β -sitosterol y taraxasterol fue ligeramente superior a los tratamientos

control (22,49; 12,14 y 18,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente). Así mismo, los valores de producción registrados con CDsH fueron similares a los obtenidos en los tratamientos combinados con MJ (20,51; 12,16 y 13,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las CDsM incrementan de forma marcada la producción de fitoesteroles (isofucoesterol y β -sitosterol) y de taraxasterol en cultivos celulares de MT. Conviene, no obstante, tener presente que las CDs pueden extraer esteroles libres y otros componentes de las membranas celulares (Zidovetzki y Levitan, 2007; Raffaele et al., 2009), si bien su capacidad para secuestrar estos compuestos depende de las propiedades fisicoquímicas de las mismas. Así, Piel et al. (2007), al analizar la capacidad de diferentes tipos de β CDs para formar complejos de inclusión con el colesterol en liposomas, observaron que las CDsM tienen una gran afinidad para secuestrar a este compuesto, debido a su mayor carácter hidrofóbico en comparación con otras CDs como las CDsH.

Sin embargo, las diferencias observadas en la producción de fitosteroles en los cultivos celulares tratados con CDs no pueden explicarse teniendo en cuenta únicamente la capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión con los esteroles, ya que en las plantas las membranas celulares contienen, en términos generales, menos isofucoesterol (<10 %) que β -sitosterol (50%) (Clouse, 2002). Por lo tanto, nuestros resultados indican que las CDs podrían actuar como agentes secuestrantes y, también, como inductores de la biosíntesis de estos compuestos terpénicos. En este sentido, son muchos los autores que sugieren que las CDs actúan como verdaderos elicitores promoviendo la biosíntesis de metabolitos secundarios en diferentes cultivos celulares, principalmente aquellos compuestos relacionados con la defensa, (Morales et al., 1998; Bru et al., 2006; Zamboni et al., 2006 y 2009; Almagro et al., 2011a y 2012; Belchí-Navarro et al., 2013).

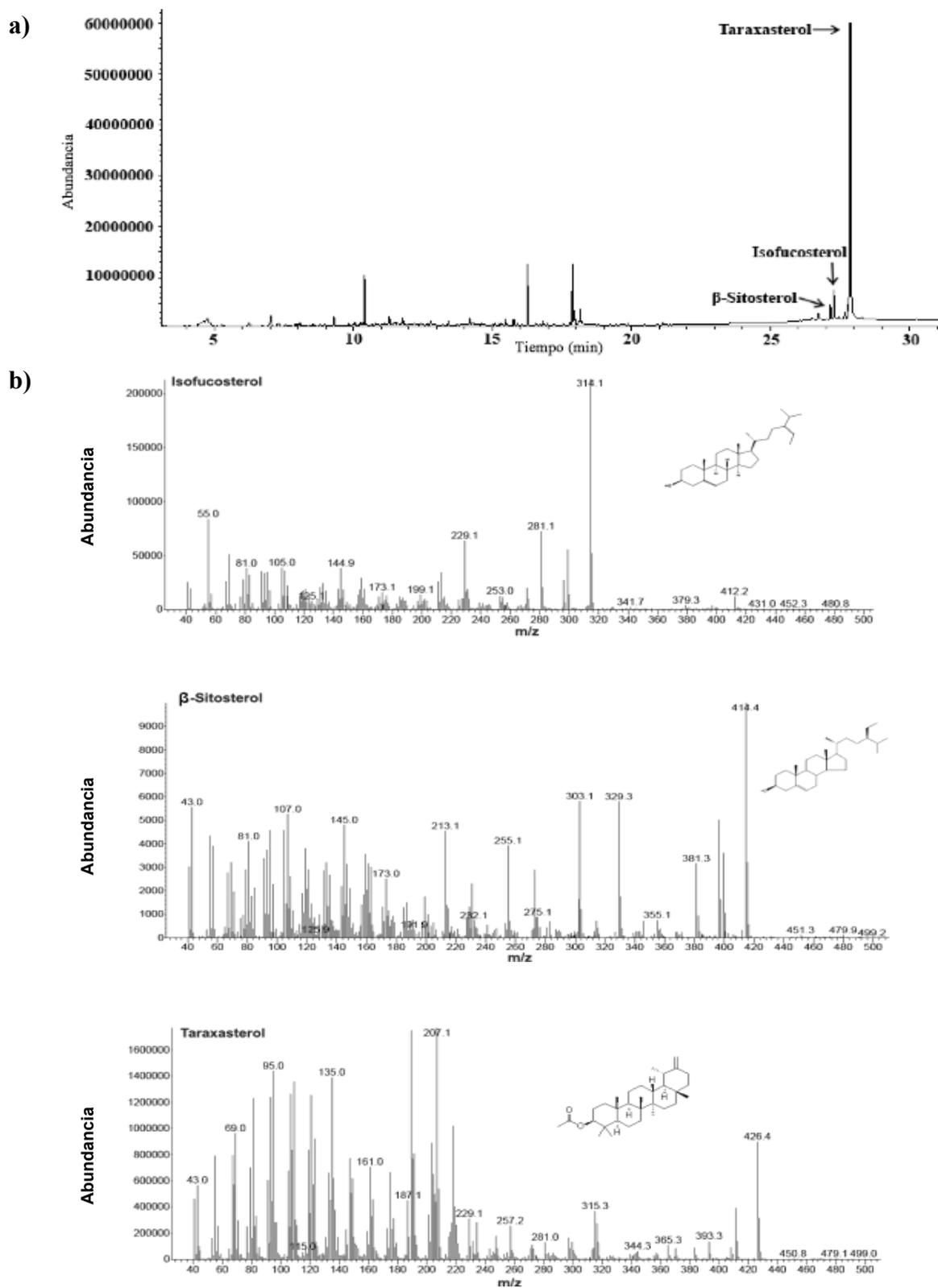


Figura 4.14. (a) Perfil cromatográfico de uno de los extractos de terpenoides correspondiente al medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT. (b) Espectros de masas y estructuras químicas de los compuestos isofucosterol, β -sitosterol y taraxasterol.

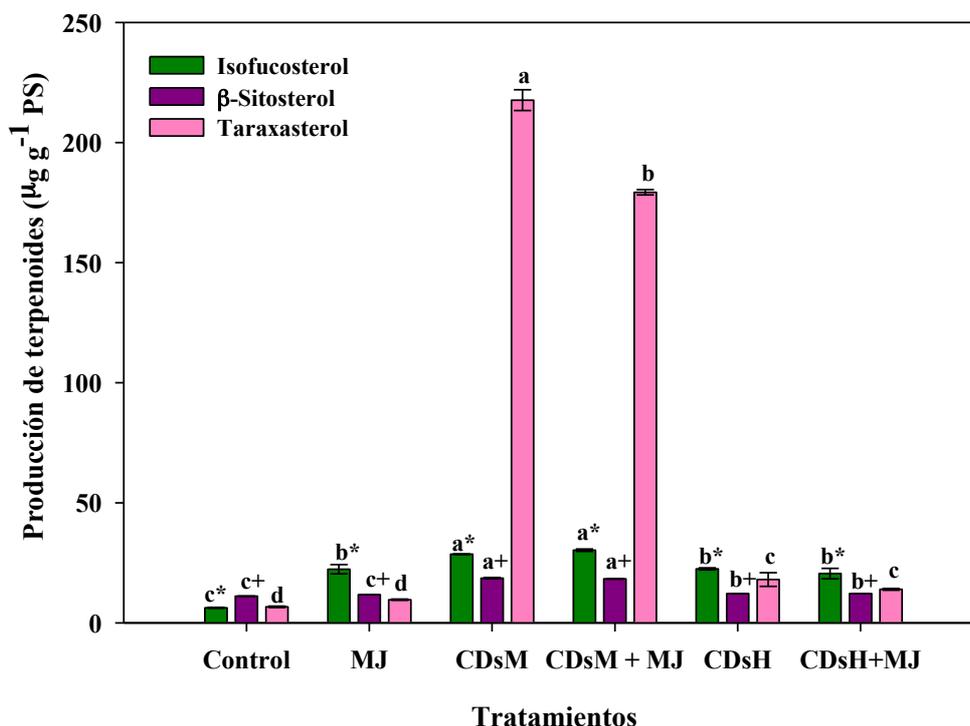


Figura 4.15. Producción extracelular de terpenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en suspensiones de tomate cv. MT elicidas con $100 \mu\text{M}$ de MJ separadamente o en combinación con 50 mM de CDs (isofucosterol, ■; β -sitosterol ■; taraxasterol ■). Los elicitors se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representados son las medias \pm SD de dos experimentos independientes. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

Además, Bru et al. (2006) utilizando suspensiones celulares de vid de dos cultivares, Monastrell y Gamay, observaron que los mayores niveles de *trans*-resveratrol se obtienen con CDsm y que éstos superan en 4,4 y 3,0 veces, respectivamente, los valores de producción obtenidos con CDsh. Por tanto, a tenor de estos resultados, se puede sugerir que la naturaleza fisicoquímica de las CDs influye en su capacidad para actuar como agentes secuestrantes y en su capacidad para estimular la producción de metabolitos.

Recientemente se ha descrito que los fitosteroles están implicados en las respuestas de defensa de las plantas. Posé et al. (2009) han sugerido que los fitosteroles juegan un

papel esencial en la localización de las NADPH oxidasas necesarias para la regulación de los niveles de ROS, de las respuestas estomáticas y de la tolerancia a la sequía. Además, en plantas de *Arabidopsis thaliana*, la sobreexpresión de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS), responsable de proporcionar los precursores para la biosíntesis de fitosteroles, parece estar implicada en el aumento de la resistencia frente a *Botrytis cinerea* y H₂O₂ (Wang et al., 2012). Por tanto, teniendo en cuenta estos estudios, se puede inferir que la secreción de fitosteroles en cultivos celulares de Micro-Tom estaría relacionada con las respuestas de defensa inducidas por la presencia de elicitores.

Sin embargo, en la bibliografía no se han encontrado referencias que indiquen que la acumulación de taraxasterol, que es un triterpenoide muy común en la cutícula de los frutos de tomate (Wang et al., 2011), esté implicado en las respuestas defensivas inducidas por elicitores. En una revisión reciente se ha señalado la importancia de los componentes cuticulares en la inmunidad de las plantas y en los mecanismos de defensa, y se sugiere que la cutícula no es sólo una barrera física, sino que es, además, una defensa activa que genera moléculas señal y moléculas efectoras en respuesta al ataque de patógenos (Reina-Pinto y Yephremov, 2009).

Teniendo en cuenta que los niveles de isofucoesterol y taraxasterol acumulados en el medio extracelular de las suspensiones celulares elicidadas sólo con MJ fueron completamente diferentes a los encontrados cuando los cultivos celulares fueron elicidados con CDsM (Figura 4.15), se puede inferir que el MJ y, sobre todo, las CD inducen la biosíntesis de estos compuestos en tomate MT, si bien de forma diferente. La biosíntesis de los esteroides y los triterpenos se inicia con la unión de dos moléculas de farnesil difosfato para dar escualeno, que es un compuesto de 30 átomos de carbono que, posteriormente, sufre una epoxidación para dar 2,3-óxido de escualeno, que es el precursor común de un gran número de triterpenoides (Abe et al., 1993; Mangas et al., 2006; Boutté y Grebe, 2009). Si el 2,3-óxido de escualeno adopta una configuración silla-silla-silla-bote, la ruta biosintética conduce a la formación de compuestos triterpénicos con cinco ciclos, tipo taraxasterol, y si adquiere la configuración espacial silla-bote-silla-bote, se puede formar cicloartenol, a partir del cual se forman los

fitosteroles. En este sentido, los resultados encontrados en este estudio sugieren que las rutas de biosíntesis aguas abajo del 2,3-óxido de escualeno se vieron afectadas de forma diferente por las CDsM y por el MJ. Así, en los tratamientos con CDsM, el 2,3-óxido de escualeno es canalizado hacia la formación de taraxasterol, mientras que en los tratamientos con MJ se canaliza hacia la síntesis de fitosteroles.

II.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidadas con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas

II.3.1. Efecto del jasmonato de metilo y ciclodextrinas, por separado o en combinación, sobre el contenido de fenoles solubles totales en suspensiones celulares de tomate cv. MT

Tras la elicitación de las suspensiones celulares de tomate cv. MT con 50 mM de CDsM o CDsH solas o en combinación con 100 μ M de MJ, se realizó la extracción de los compuestos fenólicos solubles totales presentes tanto en el medio extracelular como en el intracelular. En la Figura 4.16a se muestra el contenido de fenoles solubles totales en el medio extracelular en los distintos tratamientos. En dicha figura puede observarse que los niveles de fenoles solubles totales en el control fueron de $110,50 \pm 3,03 \mu\text{g}$ equivalentes de ácido clorogénico g^{-1} PF y que en los tratamientos con MJ se produce un fuerte incremento en los niveles de estos compuestos, 8,3 veces superior al tratamiento control. En los tratamientos con CDsH se obtuvieron unos niveles de fenoles solubles totales que superaron en 11,1 veces a los registrados en el control y en los tratamientos con CDsM el incremento fue 15,8 veces superior al tratamiento control. Los máximos niveles de fenoles se registraron en los tratamientos combinados CDs y MJ, aunque el incremento observado tras la adición de MJ no fue tan elevado como en los tratamientos control, observándose un aumento de los niveles de fenoles del 16 % en los tratamientos combinados CDsM y MJ respecto al tratamiento con CDsM y del 22,9 % en los tratados con CDsH y MJ respecto al tratamiento con CDsH.

Respecto al contenido de fenoles solubles totales en las células, se observa un patrón similar al encontrado en el medio extracelular (Figura 4.16b). Así, el menor contenido en fenoles solubles totales se registró en los tratamientos control ($570,19 \pm 7,58 \mu\text{g}$ equivalentes de ácido clorogénico g^{-1} PF) y tras la elicitación con MJ la producción de estos compuestos casi se duplicó. Cuando las suspensiones se trataron únicamente con CDsH, los niveles de fenoles aumentaron 2,3 veces con respecto al control, aunque con CDsM el incremento es de 3,6 veces.

Los máximos niveles de fenoles solubles totales se obtuvieron en los tratamientos combinados, aunque el aumento observado tras la adición de MJ no fue tan marcado como el observado en el tratamiento control, siendo este incremento del 50,5 % en los tratamientos combinados CDsH y MJ respecto al tratamiento con CDsH y del 20,5 % en los tratados con CDsM y MJ respecto al tratamiento con CDsM.

El uso de compuestos químicos como el MJ para aumentar la producción de metabolitos secundarios, incluyendo a los compuestos fenólicos, ha sido ampliamente estudiado (revisado en Bourgaud et al., 2001; Wasternack, 2007; Matkowski, 2008; Wasternack y Hause, 2013). Asimismo está bien documentado que el uso combinado de diferentes elicitors puede mejorar la producción de metabolitos secundarios en muchos cultivos celulares (Zhao et al., 2000 y 2005). En este sentido, los resultados encontrados en este estudio coinciden con los obtenidos en cultivos celulares de *V. vinifera* (Belchí-Navarro et al., 2012 y 2013) y *C. roseus* (Almagro et al., 2011a) en los que se describe que el tratamiento combinado de 50 mM CDsM y 100 μM de MJ tienen un efecto sinérgico sobre la producción de *trans*-resveratrol y ajmalicina, respectivamente.

Zhang et al. (2002) también describieron un fuerte incremento en la producción de antocianinas en cultivos celulares de *V. vinifera* tras la exposición de las suspensiones a luz continua (8000-8300 lux) en presencia de 20 μM de MJ. Sin embargo, en cultivos celulares de *S. marianum* no se observó un incremento significativo en la acumulación de silimarina tras la adición simultánea de MJ y CDsM, aunque, si el MJ se aplica tres días después de la adición de las ciclodextrinas, la producción de este flavolignano aumenta (Belchí-Navarro et al., 2011).

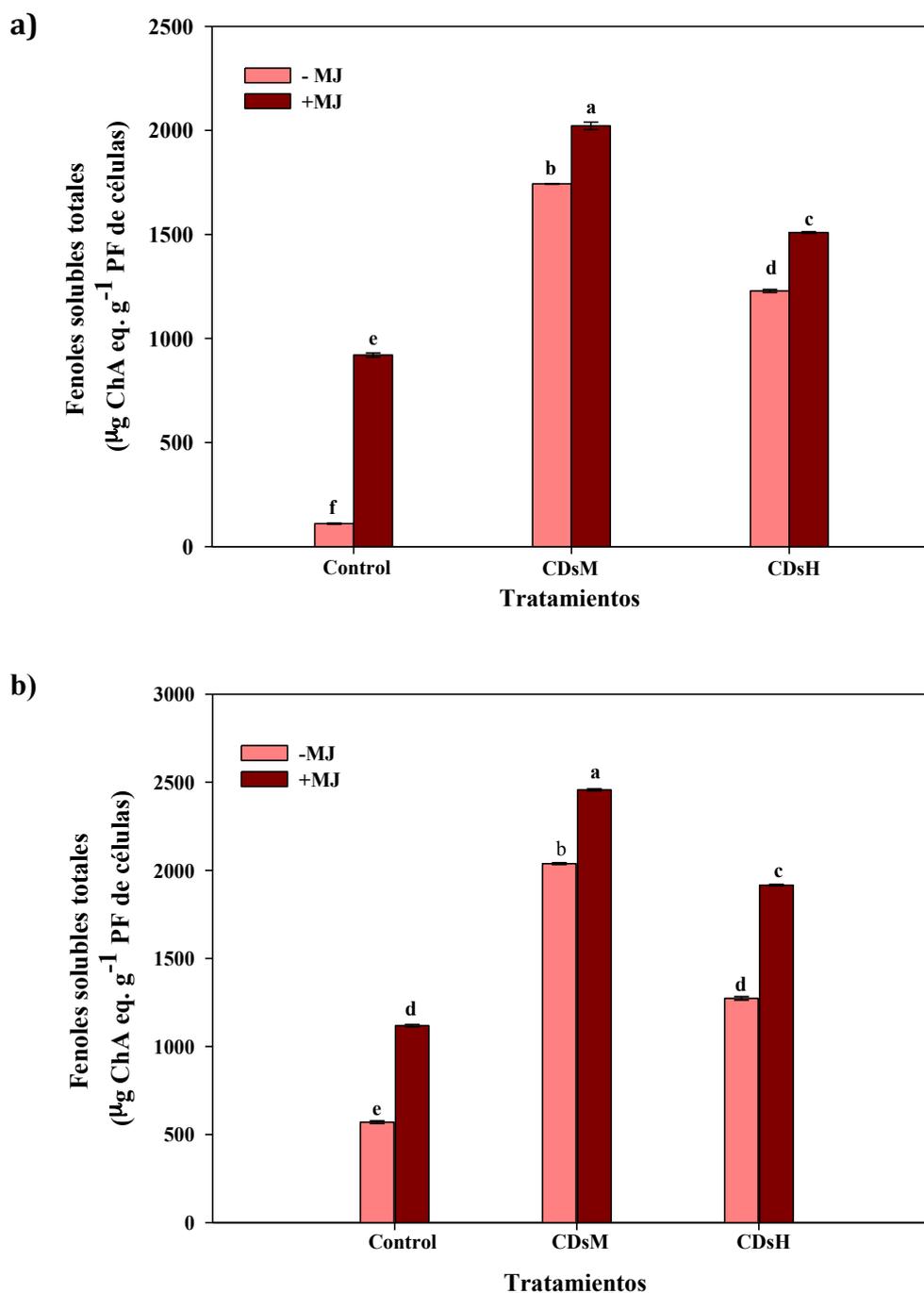


Figura 4.16. Contenido de fenoles solubles totales en el medio extracelular (a) e intracelular (b) de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicitadas con 100 μM MJ separadamente o en combinación con 50 mM de CD_sM o con 50 mM CD_sH. Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representados son las medias \pm SD de tres experimentos independientes. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

II.3.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre el contenido de fenoles individuales en suspensiones celulares de tomate cv. MT

Una vez analizadas las variaciones en los niveles de fenoles solubles totales, se procedió a la identificación de los fenoles individuales en los distintos tratamientos mediante HPLC-MS, tanto en el medio extracelular como en el intracelular, aunque su cuantificación sólo se pudo llevar a cabo en la fracción intracelular. Todos los cromatogramas correspondientes a los distintos tratamientos se caracterizaron por la presencia de un gran número de compuestos fenólicos, muchos de los cuales no pudieron ser identificados debido a que sus espectros de masas y tiempos de retención no coincidían con los de los patrones comerciales ni con los señalados en la bibliografía (Martínez-Valverde et al., 2002; Mattila y Kumpulainen, 2002; Moco et al., 2006a y 2007).

En los extractos analizados por HPLC-MS se identificó y cuantificó el ácido cafeico. Así, como se puede observar en la Figura 4.17, el contenido de ácido cafeico en los tratamientos control fue de $2,34 \pm 0,23 \mu\text{g g}^{-1}$ PF y tras la elicitación con MJ los niveles de cafeico se triplicaron. En los tratamientos con CDsM y con CDsH, los niveles de ácido cafeico aumentaron 4 veces con respecto a los registrados en el control. Los máximos niveles de cafeico se registraron en los tratamientos combinados CDs y MJ (30 y $28 \mu\text{g g}^{-1}$ PF tras la adición de CDsM+MJ y CDsH+MJ, respectivamente), por lo que el incremento observado tras la adición de MJ, en estos casos, fue mucho más marcado (12 veces superior al control) que el obtenido en los tratamientos control y MJ (3 veces superior al control).

Los resultados obtenidos sugieren que ambos elicitors actúan de forma sinérgica en la producción de ácido cafeico. Estos resultados, como hemos mencionado anteriormente, coinciden con los obtenidos en diferentes cultivos celulares (Zhao et al. 2000; Lijaveztky et al., 2008; Almagro et al., 2011a; Belchí-Navarro et al., 2012 y 2013). Además, en plantas de tomate también se ha descrito un incremento de diversos

compuestos fenólicos, como los ácidos cinámico, cumárico, clorogénico y ferúlico, tras el uso combinado de JA y SA (El-Khallal, 2007).

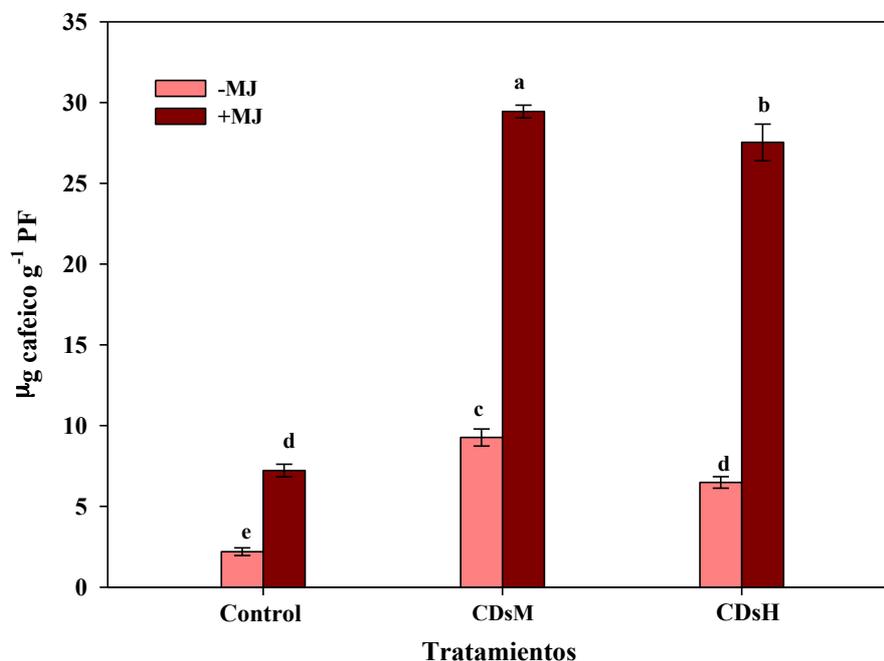


Figura 4.17. Contenido de ácido cafeico en el medio intracelular en suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidas con 100 µM de MJ separadamente o en combinación con 50 mM de CDsM o con 50 mM CDsH. Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representados son las medias \pm SD de dos experimentos independientes. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

Son muchos los trabajos que ponen de manifiesto que los compuestos fenólicos, en concreto los fenilpropanoides, son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y la adaptación de las plantas al medio ambiente (revisado por Vogt, 2010). Además, la mayoría de los compuestos fenólicos son potentes antioxidantes y aparte de las funciones fisiológicas que desempeñan en las plantas, tienen interés comercial por ejercer un efecto beneficioso para la salud humana en muchas enfermedades relacionadas con procesos de estrés oxidativo (Soobrattee et al., 2005; Valko et al., 2006). En este sentido, se ha descrito que el ácido cafeico es un potente antioxidante (Gulcin 2006; Mori et al., 2009), que posee, además, propiedades antivirales (Ikeda et

al., 2011), anticancerígenas (Rajendra-Prasad et al., 2011) y antiinflamatorias (Chao et al., 2009). Además, uno de sus derivados, el éster fenético del ácido cafeico (CAPE, caffeic acid phenethyl ester), presenta importantes efectos terapéuticos ya que es antidiabético, protector hepático y un antitumoral efectivo en los tratamientos de cáncer de pulmón (Celik et al., 2009; Wu et al., 2011).

III. Análisis del proteoma en cultivos celulares de tomate (Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom) elicitados con Jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas

III.1. Patrón isoenzimático de peroxidasas extracelulares e intracelulares de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidas con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas

El patrón de isoenzimas de peroxidasa correspondiente a los ensayos de elicitación con MJ y/o CDs en el medio extracelular e intracelular se muestra en la Figura 4.18. Teniendo en cuenta que el análisis de los patrones electroforéticos, obtenidos mediante isoelectroenfoque, de las isoenzimas de peroxidasa presentes en las suspensiones, tanto en el medio extracelular como intracelular, a lo largo del cultivo mostraron que durante la fase de crecimiento activo predominan las peroxidasas básicas (ver Figura 4.10a y b), en este ensayo nos centramos en dicho rango de pH.

En el medio extracelular (Figura 4.18a) se observa la presencia de, al menos, cinco isoenzimas comunes a todos los tratamientos. Los pIs de dichas isoformas estuvieron comprendidos en el rango de 6,9-8,6. La primera banda, con un pI neutro, presentó una baja actividad en todos los tratamientos, mientras que la banda con pI estimado de 7,5 presentó la tinción más intensa. Dos isoenzimas, una con un pI en torno a 7,8 y otra con un pI de 8,3, presentaron una reactividad media, mientras que la isoenzima con un pI fuertemente básico ($pI > 8,5$) mostró menor intensidad de tinción en los ensayos de elicitación con CDsH solas o en combinación con MJ+CDsH, mientras que en los ensayos con CDsM y MJ+CDsM presentó una mayor tinción. En presencia de MJ no se observaron diferencias con respecto al zimograma obtenido en los tratamientos control.

El patrón isoenzimático de los extractos celulares (Figura 4.18b) mostró la presencia de, al menos, cuatro isoformas: una de pI neutro (alrededor de 6,9) y tres bandas con pI básico (7,5, 8,3 y 8,6). La isoenzima fuertemente básica (pI 8,6) fue la que presentó mayor actividad peroxidasa en los tratamientos control y en los elicitados solamente con MJ. En el resto de los tratamientos de elicitación, el patrón isoenzimático fue similar al control, aunque la intensidad relativa de las distintas bandas varió; así, se observó en los tratamientos con CDsM y MJ+ CDsM una tinción más intensa de las bandas de pIs en torno a 6,9, 7,5, 8,3 y 8,6 con respecto al control. En los ensayos con CDsH se observó una mayor actividad en la banda de pI 6,9 y, sobre todo, en las isoenzimas fuertemente

básicas (pIs 8,3 y 8,6). Finalmente, en el tratamiento combinado MJ+CDsH destaca la notable tinción de la isoenzima de pI fuertemente básico (8,6). Los resultados encontrados en este estudio, sugieren que los tratamientos con CDs y/o MJ no varían de forma cualitativa el patrón de isoenzimas de peroxidasa, ni en el medio extracelular ni en el celular, aunque sí modifican la intensidad de la tinción de las distintas isoformas, sobre todo la de las de naturaleza fuertemente básica.

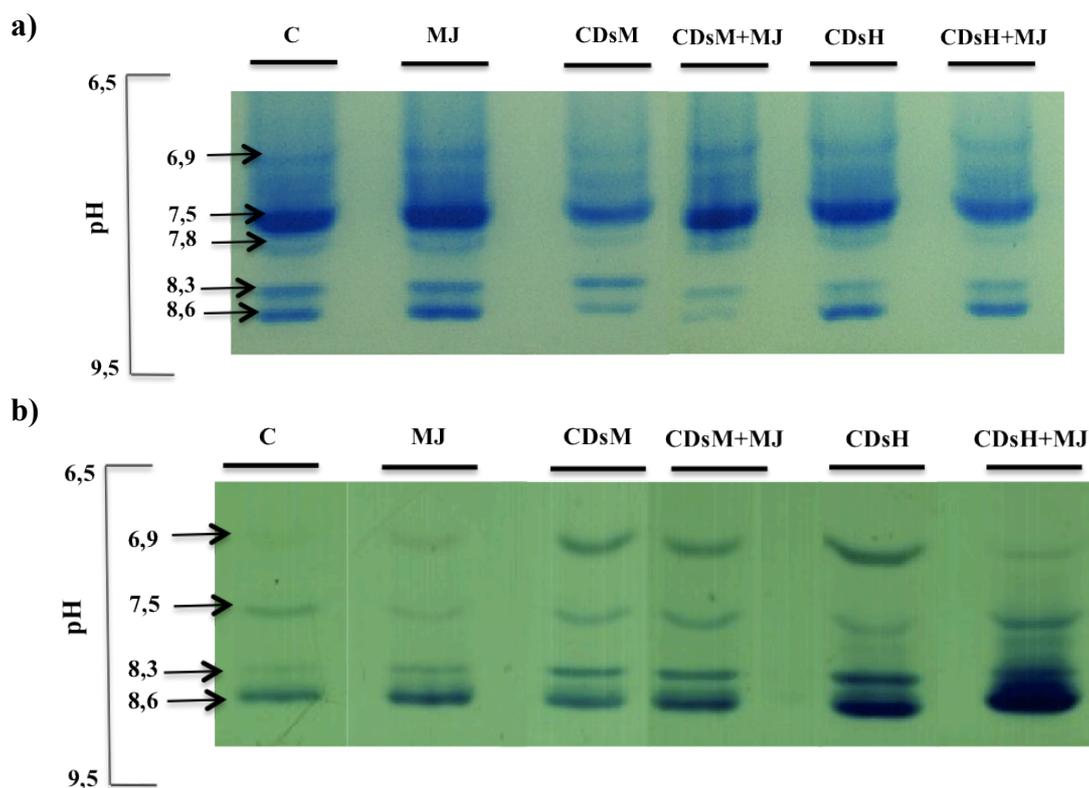


Figura 4.18. Patrones isoenzimáticos de peroxidasas, obtenidos mediante IEF y revelados con 4-MN y H₂O₂, en el medio extracelular (a) e intracelular (b) de suspensiones celulares de tomate elicidadas con MJ (100 μ M) y/o CDs (50 mM). Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación y las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación.

III.2. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre la actividad peroxidasa extracelular e intracelular en suspensiones celulares de tomate cv. MT

Los niveles de actividad peroxidasa soluble específica, determinada con TMB, en los medios extracelular e intracelular, de las suspensiones elicidadas con MJ y/o CDs se muestran en la Tabla 4.1. En ella se observa que la elicitación con MJ sólo o en combinación con CDsM provocó un aumento de la actividad peroxidasa extracelular con respecto al control (1,25 y 1,29 veces, respectivamente). Sin embargo, la elicitación sólo con CDs dio lugar a unos valores de actividad peroxidasa similares al control, si bien en los tratamientos con CDsM la actividad peroxidasa se redujo en un 11% con respecto al control. Así mismo, no se observaron diferencias significativas con respecto al control en los tratamientos combinados CDsH+MJ.

Teniendo en cuenta la similitud, desde un punto de vista cualitativo, de los patrones isoenzimáticos correspondientes a las fracciones extracelulares de los distintos tratamientos de elicitación y el control (ver Figura 4.18a), las variaciones de actividad peroxidasa soluble detectadas no pueden atribuirse a cambios en el polimorfismo enzimático inducidos por la adición de elicitores. Estos resultados contrastan con los descritos en suspensiones celulares de vid cv. Monastrell elicidadas con CDsM y/o MJ, en las que se observó una fuerte disminución de la actividad peroxidasa extracelular (estimada como nKat/ml de suspensión) en los tratamientos con los distintos elicitores (Belchí-Navarro, 2012).

En relación con la actividad peroxidasa intracelular, en la Tabla 4.1 se observa que la elicitación con MJ no afectó a los niveles de actividad, aunque en los tratamientos combinados se observó un fuerte incremento de la actividad peroxidasa específica, siendo este incremento 1,5 veces superior al control en el tratamiento con CDsM y MJ y 2,3 veces superior con CDsH y MJ. Los mínimos valores de actividad peroxidasa soluble específica se obtuvieron en los tratamientos con CDsM, al igual que se observó en el medio extracelular, aunque en presencia de CDsH los valores de actividad peroxidasa intracelular fueron 1,7 veces superior a los registrados en el control.

Tabla 4.1. Actividad peroxidasa soluble específica en el medio extracelular e intracelular, usando como sustratos TMB y H₂O₂, en suspensiones celulares de tomate elicidadas con MJ (100 µM) y/o CDs (50 mM). Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representan el promedio de tres réplicas ± error estándar. Las medias seguidas de diferentes letras, en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

Tratamiento	Actividad Prx (µKat mg ⁻¹ proteína)	
	Extracelular	Intracelular
Control	10,39 ± 0,29 ^c	4,77 ± 0,05 ^e
MJ	12,96 ± 0,31 ^a	4,97 ± 0,03 ^d
CDsM	9,22 ± 0,16 ^d	2,69 ± 0,04 ^f
CDM+MJ	13,38 ± 0,13 ^a	7,19 ± 0,04 ^e
CDsH	11,57 ± 0,15 ^b	8,13 ± 0,03 ^b
CDsH+MJ	10,18 ± 0,17 ^{c,d}	10,79 ± 0,03 ^a

En cuanto a la relación entre los cambios en la actividad peroxidasa intracelular tras la adición de los elicitores y sus patrones isoenzimáticos correspondientes (Figura 4.18b), la interpretación resulta un tanto complicada. Si bien parece que existe una correlación entre la intensidad de la isoforma fuertemente básica (pI 8,6; Figura 4.18b) y la actividad enzimática en los tratamientos con CDsH sólo o combinado con MJ.

III.3. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre la actividad fenilalanina amonio liasa intracelular en suspensiones celulares de tomate cv. MT

Con el fin de analizar la relación entre los niveles de fenoles solubles totales (Figura 4.16) y los niveles de ácido cafeico (Figura 4.17) con la actividad PAL, se procedió a la cuantificación de dicha actividad enzimática en los extractos celulares tras los ensayos de elicitación con MJ y/o CDs.

En la Figura 4.19 se puede observar que los valores de la actividad PAL en los tratamientos de elicitación con MJ provocaron un moderado aumento de dicha actividad, siendo ésta 1,35 veces superior al control. Por el contrario, los valores de actividad observados en los tratamientos con CDs fueron del mismo orden que los del control, aunque en los tratamientos con CDsH los valores obtenidos fueron 1,2 veces superior al control. Los máximos valores de actividad se obtuvieron en los tratamientos combinados, siendo este incremento 1,6 veces superior al control en el tratamiento con CDsM y MJ y 2 veces superior al control en el ensayo de elicitación con CDsH y MJ.

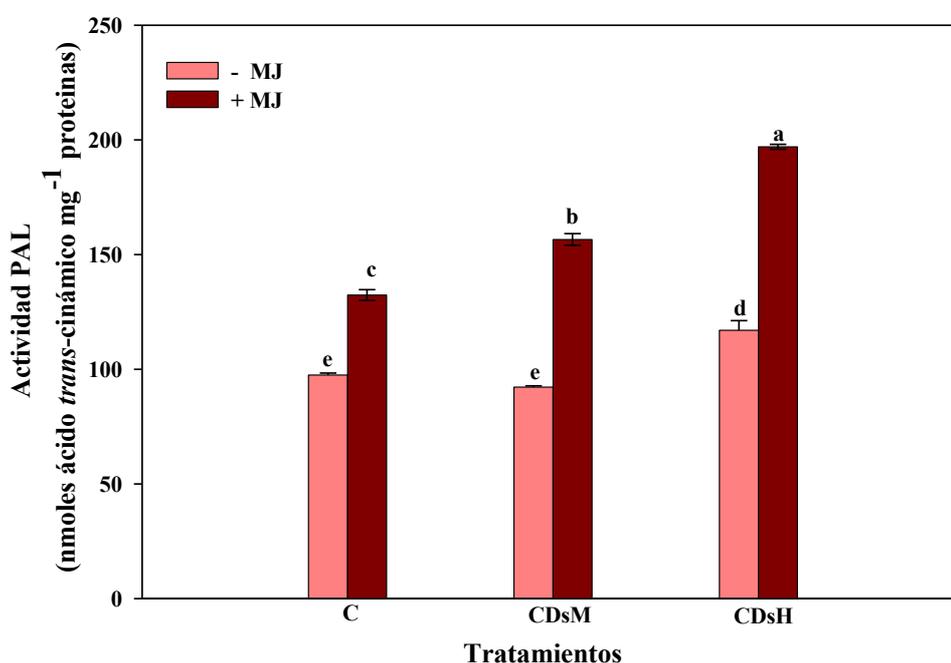


Figura 4.19. Actividad fenilalanina amonio liasa en el medio intracelular de suspensiones celulares de tomate elicidadas con MJ (100 μ M) y/o CDs (50 mM). Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

Estos resultados ponen de manifiesto que el uso combinado de estos elicitores provocó un mayor incremento de la actividad PAL. En este sentido, numerosos estudios describen que la actividad enzimática PAL está fuertemente influenciada por distintos tipos de elicitores, como MJ (Gundlach et al., 1992; Mandal et al., 2013), SA (Dong et

al., 2010; López-Orenes et al., 2013), extractos de levaduras (Gómez-Vásquez et al., 2004), elicitores fúngicos (Campbell y Ellis, 1992; Szabo et al., 1999; Khan et al., 2003) y elicitores abióticos (Maeda et al., 2005; Yan et al., 2006).

Está bien establecido que la PAL determina el flujo de carbono (Phe) hacia varias rutas del metabolismo fenilpropanoide (Dixon y Paiva, 1995; Dixon et al., 2002), así como la velocidad de producción de compuestos fenilpropanoides (Bate et al., 1994). Estos hechos han sido constatados en gran número de estudios en los que se ha descrito una correlación positiva entre el uso de elicitores, la actividad PAL y el contenido de fenoles en cultivos celulares (como, por ejemplo, zanahoria, Sircar y Mitra, 2008; *Salvia miltiorrhiza*, Dong et al., 2010; y *Lithospermum erythrorhizon*, Ogata et al., 2004), en vástagos de *Cistus heterophyllus* (López-Orenes et al., 2013), en hojas de soja (Khan et al., 2003) y en gran número de frutos (Ruíz-García y Gómez-Plaza, 2013).

En general, en este estudio también se observó que los tratamientos que estimulan la actividad PAL promueven una mayor acumulación de fenoles solubles totales (Figura 4.16) y de ácido cafeico (Figura 4.17), tanto en el medio intracelular como en el extracelular. No obstante, la máxima actividad PAL se obtuvo en los tratamientos de elicitación con CDsH y MJ, mientras que los máximos niveles de compuestos fenólicos se obtuvieron en los tratamientos con CDsM y MJ. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este último tratamiento de elicitación (CDsM y MJ) los niveles de actividad peroxidasa son bajos (Tabla 4.1), lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor acumulación de estos compuestos fenólicos.

III.4. Patrón proteínas totales extracelulares e intracelulares de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidas con jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas

El patrón de proteínas totales correspondiente a los ensayos de elicitación con CDs y/o MJ de los medios extracelular e intracelular se muestra en la Figura 4.20.

En el electroforeograma SDS-PAGE del medio extracelular (Figura 4.20a) se observa un perfil de proteínas simple, tanto en los tratamientos control como en los elicitados. En todos los tratamientos se detectaron al menos, seis bandas proteicas cuyos pesos moleculares aparentes son: 21, 29, 32, 33, 35 y 46 kDa y las proteínas mayoritarias tienen un peso molecular inferior a 35 kDa. Así mismo, no se observaron nuevas bandas en los tratamientos elicitados, aunque se aprecian diferencias en la intensidad de la tinción entre los distintos tratamientos de elicitación.

El perfil de las proteínas totales correspondiente al medio intracelular fue mucho más complejo y se observan bandas proteicas con masas moleculares comprendidas entre los 21-77 kDa (Figura 4.20b). En todos los tratamientos se detectaron al menos cuatro proteínas mayoritarias, de pesos moleculares aparentes comprendidos entre 34 y 50 kDa, rango que se corresponde con el peso molecular medio de la mayoría de las proteínas (bandas c-f; Figura 4.20b). Aunque no se observa la aparición de nuevas bandas en los tratamientos elicitados con respecto al control, se aprecian cambios en la intensidad de tinción en dos bandas proteicas de pesos moleculares próximos a 25 kDa en los tratamientos con MJ y CD_sM+MJ (bandas a y b; Figura 4.20b).

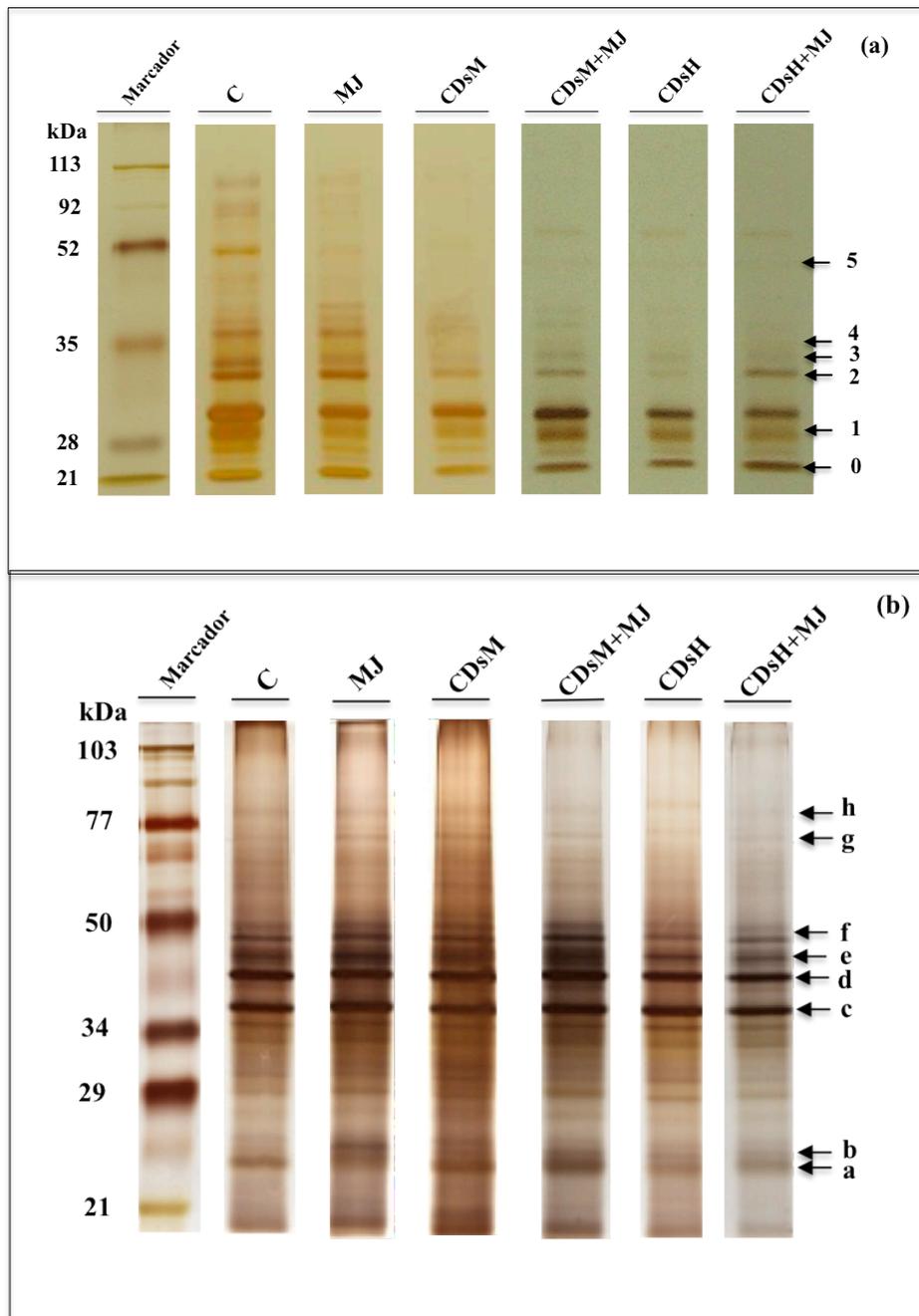


Figura 4.20. Patrón de proteínas totales del medio extracelular (a) e intracelular (b) de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicitadas con MJ (100 μM) y/o CDs (50 mM), realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y teñido con tinción de plata. Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación y las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación.

III.5. Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidadas con jasmonato de metilo y ciclodextrinas

Con el fin de verificar si los elicitores alteran la expresión de las proteínas de defensa se llevó a cabo el análisis proteómico de las bandas de proteínas extracelulares separadas por SDS-PAGE (bandas 0-5, ver Figura 4.21a) mediante microsecuenciación por nanoLC ESI MS/MS. Como el perfil proteómico extracelular fue similar en todos los tratamientos de elicitación, se decidió realizar el ensayo de microsecuenciación por nanoLC ESI MS/MS únicamente con los tratamientos combinados con CDsM y MJ.

Antes de este análisis, se procedió a la cuantificación de las bandas 0-5 con respecto a los tratamientos control. En la Figura 4.21 se observan los perfiles electroforéticos correspondientes a los tratamientos control y CDsM+MJ (Figura 4.21a), así como la cuantificación de las cinco bandas proteicas seleccionadas para su análisis mediante microsecuenciación. Como se observa en la Figura 4.21b, las intensidades relativas de las bandas proteicas 0 y 1 en los tratamientos con CDsM y MJ son similares a las del tratamiento control. Sin embargo, las intensidades relativas de las bandas 2, 3, 4 y 5 son claramente inferiores a las del control, obteniéndose unos valores de intensidad relativa de 22 ± 18 , 33 ± 18 , 16 ± 6 y 7 ± 5 , respectivamente.

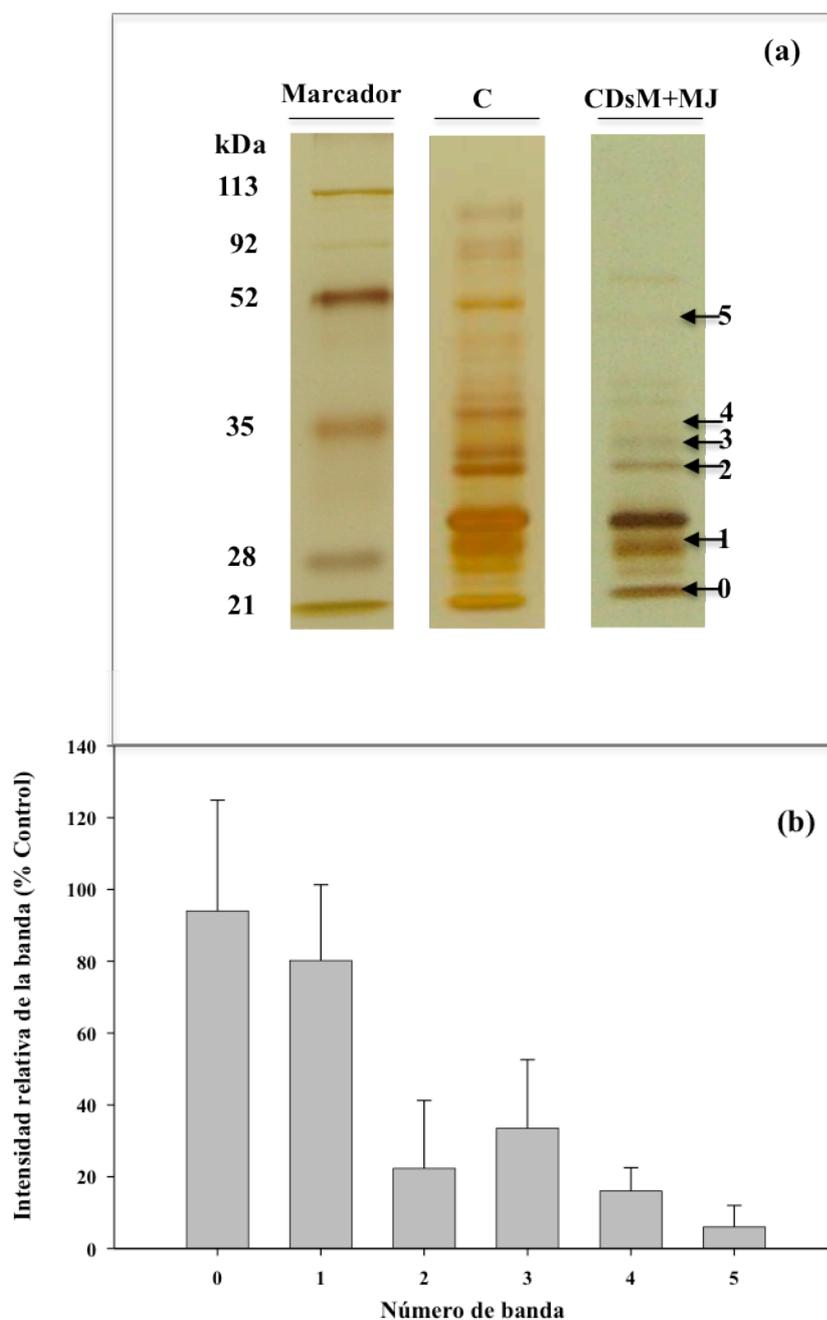


Figura 4.21. (a) Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT, a los 10 días de cultivo, obtenido mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y teñido con plata. (b) Intensidad relativa de las diferentes bandas proteicas (0-5) correspondiente al tratamiento CDsm+MJ. Los valores fueron calculados como porcentaje de intensidad relativa de cada banda con respecto a su correspondiente banda en el control. Los valores representados son las medias \pm error estándar de tres electroforesis SDS-PAGE.

Tras la cuantificación se procedió a la realización del ensayo de microsecuenciación. Mediante la comparación de los fragmentos trípticos obtenidos a partir de la banda con peso molecular aparente de 21,3 kDa (banda 0; Figura 4.21a), tanto en los cultivos control como en los tratamientos de elicitación combinando CDsM y MJ, se identificaron nueve fragmentos trípticos presentes únicamente en los tratamientos combinados (Tabla 4.2), lo que sugiere que estos fragmentos fueron inducidos como consecuencia del proceso de elicitación.

Estos fragmentos contenían secuencias de aminoácidos que presentaban homología con tres proteínas PR de *S. lycopersicum*, en concreto con el fragmento interno de la proteína PR-1 (Tom P14c; N° de acceso AAB34612), una proteína PR P23 (N° de acceso CAA50059) y una proteína NP24 (N° de acceso P12670), que es una proteína PR P23 proteína inducida por salinidad (ver Tabla 4.2). Igualmente, fueron identificadas una quitinasa de tomate (N° de acceso BAC76900) y una proteína asociada a la muerte celular causada por agentes bióticos (N° de acceso AAF15902). Así mismo, a partir de la banda 2 (Figura 4.21a), uno de los fragmentos trípticos obtenidos del tratamiento combinado con CDsM y MJ mostró homología con una peroxidasa catiónica de *Nicotiana tabacum* (N° de acceso BAA07663; Tabla 4.2).

Además de estas proteínas inducibles por los tratamientos combinados con CDsM y MJ, se observó la presencia de otras proteínas PR en todas las bandas de proteínas procedentes tanto del tratamiento control (Figura 4.21a; calle C) como de los tratamientos elicitados con CDsM y MJ (Figura 4.21a; calle CDsM+MJ). Esas proteínas PR fueron del tipo PR-1 y PR-5, endoquitinasas, quitinasas, peroxidasa y otras enzimas hidrolíticas (ver Tabla 4.3).

De los resultados obtenidos tras la microsecuenciación por nanoLC ESI MS/MS, se puede sugerir que los tratamientos con CDsM+MJ inducen la expresión de varias proteínas relacionadas con la defensa (Tabla 4.2), aunque otras son constitutivas (Tabla 4.3). Dentro de las inducidas, cabe señalar que la proteína Tom P14c (PR-1) presenta una elevada actividad antifúngica frente a *Phytophthora infestans* tanto *in vivo* como *in vitro* (Niderman et al., 1995). Así mismo, se ha descrito que la proteína PR de 23 kDa se induce en plantas de tomate infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos

(Fagoaga et al., 2001). Esta proteína (PR P23), que pertenece a la familia de la taumatina (familia PR-5), mostró una elevada homología con la secuencia aminoacídica de la proteína de tomate NP24, proteína que se induce por sal y que pertenece a la familia de la osmotina (Rodrigo et al., 1993). La mayor parte de la secuencia N-terminal de las dos isoformas de NP24 (I y II) descritas por Pressey (1997) coinciden con los dos péptidos (en *italica* en la Tabla 4.2) de las proteínas PR P23 y NP24 presentes en las suspensiones celulares de tomate cv. MT. De manera similar, también se ha observado homología entre una región del fragmento peptídico de las proteínas PR P23 y NP24 (subrayado en la Tabla 4. 2) con una secuencia alergénica de 35 aminoácidos presente en la proteína de tomate NP24I (Ghosh y Chakrabarti, 2008). Además de ser una proteína alergénica, esta proteína presenta una fuerte actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos del tipo P23, lo que sugiere que esas dos proteínas codificadas por diferentes genes son inducidas bajo distintos tipos de estrés.

De los diez péptidos inducibles por CDsM y MJ, uno mostró homología con la secuencia de aminoácidos de la proteína asociada a la muerte celular biótica de *N. glutinosa* (Tabla 4.2), que presenta actividad inhibidora de proteasas (Lippmann et al., 2009). Por último, la banda de proteínas con peso molecular aparente de 32 kDa (banda 2; Figura 4.21a), mostró homología con una isoenzima catiónica de peroxidasa (38 kDa) de *Nicotiana tabacum*. En suspensiones celulares de tabaco se ha observado que esta peroxidasa es muy abundante en el medio extracelular durante la fase de expansión celular, pero no se detecta durante la fase de proliferación celular (Narita et al., 1995). Por tanto, se puede inferir que esta enzima pudiera estar involucrada en los procesos de la expansión celular de las suspensiones celulares de tomate cv. MT.

Aparte de estas proteínas inducibles, se observó la presencia de otras proteínas PR en las bandas proteicas 0-5, tanto en los tratamientos control como en los elicitados con CDsM y MJ (Tabla 4.3), lo que sugiere que su expresión es constitutiva. Esas proteínas PR son proteínas de tipo PR-1, PR-5, endoquitinasas, quitinasas y peroxidases (Tabla 4.3), cuya expresión en los medios extracelulares en suspensiones celulares no tratadas está ampliamente recogida en la bibliografía, como en *Zinnia elegans*, *Cycas revoluta* y *Taxus baccata* (Novo Uzal et al., 2009), *Capsicum spp* (Sabater-Jara et al., 2010), *N.*

tabacum (Lippmann et al., 2009), *Vitis vinifera* cv. Gamay (Martínez-Esteso et al., 2009) y cv. Monastrel (Belchí-Navarro et al., 2013).

De hecho, catorce péptidos trípticos mostraron homología con quitinasas y endoquitinasas de *S. lycopersicum*, *S. dulcamara* y *S. tuberosum* con una elevada probabilidad (Tabla 4.3). De la misma forma, un péptido tríptico (resaltado en negrita en la Tabla 4.3, banda 1) es, probablemente, un fragmento altamente conservado tanto en quitinasas como en endoquitinasas, por lo que es bastante probable que coincida con los péptidos identificados en diferentes cultivos celulares de plantas solanáceas (Sabater-Jara et al., 2010 y 2011). Además, los péptidos que aparecen subrayados en la Tabla 4.3 también se encontraron en *N. tabacum* (Lippmann et al., 2009) y *C. annuum* (Sabater-Jara et al., 2010), por lo que es muy probable que sean fragmentos altamente conservados en la familia *Solanaceae*.

Por otra parte, diecisiete secuencias aminoacídicas identificadas en las bandas 0 y 1 (Tabla 4.3) mostraron homología con las proteínas PR-1 y PR-5 presentes en especies de los géneros *Solanum* y *Capsicum*. Las proteínas PR-1 y PR-5 están reguladas a nivel de órgano y durante el desarrollo, y sus niveles pueden incrementarse en presencia de elicitores (Tornero et al., 1994; Zhu et al., 1995; Kim y Hwang, 2000; Rep et al., 2002). Algo similar ocurre con la proteína putativa LeMir detectada en suspensiones celulares de tomate cv. MT (Tabla 4.3), y que se expresa de forma constitutiva en raíces y cultivos celulares de tomate (Brenner et al., 1998).

Las peroxidasas también se encontraron en suspensiones celulares de tomate MT, ya que se identificaron un total de veintidós secuencias aminoacídicas presentes en las bandas 2, 3 y 4, y mostraron homología con peroxidasas de *S. lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* (Tabla 4.3). Estas secuencias contienen regiones altamente conservadas que corresponden a los fragmentos resaltados en negrita en la Tabla 4.3, y que han sido descritas por Passardi et al. (2004b), tales como las secuencias GEIR en las peroxidasas de *Pisum sativum* y de los géneros *Populus*, *Capsicum*, *Vitis* y las secuencias VAL y GAHT en las peroxidasas aniónicas de diferentes especies del género *Capsicum* (Sabater-Jara et al., 2010 y 2011).

Además, se detectaron ocho fragmentos peptídicos que coinciden con la secuencia de aminoácidos de una proteína inhibidora de endoglucanasas fúngicas específicas de xiloglucano (XEGIP) y cuatro péptidos trípticos que coinciden con la secuencia de aminoácidos de una proteína inhibidora de la poligalacturonasa de *S. lycopersicum* (Tabla 4. 3). Es bien conocido que las plantas producen inhibidores proteicos contra las enzimas que degradan la pared celular y que se secretan durante el ataque por patógenos (Juge, 2006; Lagaert et al., 2009). Es por ello que la presencia de proteínas XEGIP en los cultivos celulares de tomate MT concuerda con lo señalado previamente por Qin et al. (2003) que sugieren que las XEGIP pueden estar involucradas en las respuesta de defensa inducidas por patógenos, ya que las XEGIP pueden actuar como inhibidores de las glucanasas microbianas, previniendo, por tanto, la degradación de la pared celular.

Finalmente, se identificaron cinco péptidos trípticos en la banda de proteína 5 (Figura 4.21a) que mostraron homología con proteínas putativas de la LeXYL2 y α -L-Arabinofuranosidasa (de *S. lycopersicum*, Tabla 4.3), que son enzimas implicadas en la ruptura de xilanos y arabinoxilanos y, por tanto, en la degradación de la pared celular. Cuatro de los cinco péptidos secuenciados (subrayados y en negrita en la Tabla 4.3) fueron similares a los encontrados previamente en suspensiones celulares de *C. annuum* (Sabater-Jara et al., 2010). Por lo tanto, la presencia de estas enzimas hidrolíticas en el proteoma extracelular de cultivos celulares de *S. lycopersicum* cv. MT sugiere su participación en la modificación de la arquitectura de la pared celular durante el crecimiento del cultivo celular.

Tabla 4. 2. Identificación de proteínas tomando como base los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *S. lycopersicum* cv. MT usando LC-MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Banda de Proteína	Péptidos trípticos inducidos por CDsM+MJ	Número de acceso	Proteína	Masa nominal	Score
21.3 kDa (banda 0)	LAAFAQNYANQR	AAB34612	Tom P14c: proteína relacionada con la patogénesis PR-1 <i>S. lycopersicum</i>	3984	98
	<u>NNCPYTVWAASTPIGGGR</u> GQTWVINAPR <u>CPDAYSYQDDPTSTFTCP<u>SGSTNYR</u></u>	CAA50059	Proteína relacionada con la patogénesis PR P23 <i>S. lycopersicum</i>	26024	292
	<u>NNCPYTVWAASTPIGGGR</u> GQTWVINAPR <u>CPDAYSYQDDPTSTFTCP<u>GGSTNYR</u></u>	P12670	Precursor de la proteína NP24 (proteína relacionada con la patogénesis PR P23) (proteína inducida por sal) <i>S. lycopersicum</i>	27598	278
	YEDAYALQYCPR	AAF15902	Proteína asociada a la muerte celular biótica en <i>N. glutinosa</i>	25598	93
	<u>GPIQLTHQSNYER</u>	BAC76900	Quitinasa <i>S. lycopersicum</i>	28047	58
32 kDa (banda 2)	GCDASILLDK	BAA07663	Peroxidasa catiónica 38 kDa <i>N. tabacum</i>	36542	66

Tabla 4. 3. Identificación de proteínas tomando como base los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *S. lycopersicum* cv. MT elicitados con CDsM+MJ y no elicitados usando LC-MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Banda de proteína	Péptidos trípticos Constitutivo	Número de accesión	Proteína	Masa nominal	Score
21.3 kDa (banda 0)	ENFLNAHNAAR VCGHYTQVVWR	Q08697	Precursor de la proteína relacionada con la patogénesis 1a1 (PR-1a1) <i>S. lycopersicum</i>	20046	81
	LDTNGLGYQR GNLNVNYEFVNC	P32045	Precursor de la proteína relacionada con la patogénesis P2 <i>S. lycopersicum</i>	16415	118
	<u>GPIQLTHQSNYER</u> IGFYR	Q05539	Precursor de la endoquitinasa ácida 26 kDa <i>S. lycopersicum</i>	28013	90
28.8 kDa (banda 1)	NNFYSYNAFVTAAGSFPGFGTTGDITAR <u>EQGSPGDYCTPSSQWPCAPGR</u> GPIQISHNYNYGPCGR AIGVDLLNNDLVATDPVISEK WQPSGADQAANR VPGFGVITNIINGGLECGHGSRSR YCGILGVSPGENLDCGNQR	Q05538	Precursor de la endoquitinasa básica 30 kDa <i>S. lycopersicum</i>	35292	863
	<u>EQGSPGDYCTPSSQWPCAPGRK</u> GPIQISHNYNYGPCGR SAIWFWMTPQSPK	AAP32201	29 kDa proteína de histéresis térmica tipo quitinasa <i>S. dulcamara</i>	29454	255
	NNFYSYNAFINAAR GPIQISHNYNYGPCGR	P52406	Precursor de la endoquitinasa 4 <i>S. tuberosum</i>	33209	201
	QVGVGPMTWDNR LAAFAQNYANQR VCGHYTQVVWR	AAK30143	Precursor de la proteína relacionada con la patogénesis PR-1 <i>C. annuum</i>	20481	157
	DYLAVHNDAR	AAB34610	Tom P14b: proteína relacionada con la patogénesis PR-1 <i>S. lycopersicum</i>	1832	71

	AQVGVGPMWDANLASR AGDCNLIHSGAGENLAK CRHYTQVVWR HYTQVVWR	ABA41593	Proteína relacionada con la patogénesis PR-1 <i>S. lycopersicum</i>	15361	236
	GWCQTGDCGGVLECK	AAP43673	Proteína tipo PR5 <i>S. lycopersicum</i>	28478	70
	NNCPYTVWAASTPIGGGR CHAIHCTANINGECPR CPDAYSYQDDPTSTFTCPSTNYR	CAA51430	Proteína tipo osmotina (Proteína tipo PR5) <i>S. commersonii</i>	27539	220
	TGVDYYILPVVR	AAC63057	LeMir <i>S. lycopersicum</i>	23273	69
	LAAAVPK LGIADVEYK NHGAIWDTSR VPSGALQFR FVVTAGYDGK	ABA64550	Precursor de la proteína tipo expansina <i>S. lycopersicum</i>	28863	217
32 kDa (band 2)	VGFYSSSTCPR AESIVQSTVR SHFQSDPTVAPGLLR GFEVIDDAK GLTWSVPTGR VSSASDTSNLPGFTEVDAQK GFLGLR MSNIEVLTGTNGEIR	CAH17985	Peroxidasa cevi16 <i>S. lycopersicum</i>	32180	468
	VHYHDCFVR	NP_181437	Peroxidasa <i>Arabidopsis thaliana</i>	38726	67
	MGRIGVLTGNAGEIR	CA024152	Proteína desconocida (Peroxidasa putativa de <i>V. vinifera</i>)	36108	50
32.8 kDa (band 3)	GYEVIQAK LGGQTYSVLGR EMVALAGAHTVGFAR MGDLPPSAGAQLAIR	P15003	Precursor de la peroxidasa 1 aniónica asociada a la suberización (TMP1) <i>S. lycopersicum</i>	39295	330

34.5 kDa (band 4)	DFVQQQVPK APNTAAAILR LANPNLTLR GLFQSDAALTTR	AAA65637	Peroxidasa <i>S. lycopersicum</i>	36485	284
	GVVDS AIDNETR GFEVIAQAK LGGQTYTVALGR EMVALAGAHTVGFAR	P15004	Precursor de la peroxidasa 2 aniónica asociada a la suberización (TMP1) <i>S. lycopersicum</i>	39093	215
	GLIIPVTK KFALCLTSSNSK VAVVAPFR DASTLQYLTQIQQR ISLPSQFSAEFSFPR GVVLF GDGPYFFLPNR TSIVIGGHTIEDNLLQFDHAASR LGFTSSILFR	AAN87262	Proteína inhibidora de endoglucanasa fúngicas específica de xiloglucano (XEGIP) <i>S. lycopersicum</i>	47406	636
46.0 kDa (band 5)	LTGTIPESFGR TSQVIDLSR IFGSLPPGLK CLCGSPLPK	AAA53547	Proteína inhibidora de la poligalacturonasa <i>S. lycopersicum</i>	36980	185
	<u>AVTNNFATLMR</u> <u>LGFFDGNPK</u> <u>NQLYGNLGP</u> DICTEDHQELAR	BAC98299	LeXYL2 <i>S. lycopersicum</i>	69724	201
	<u>AFVSEYAVTGNDAGK</u>	BAC99302	α -L-Arabinofuranosidasa <i>S. lycopersicum</i>	71600	72

III.6. Efecto del jasmonato de metilo y/o ciclodextrinas sobre las actividades endoquitinasa y β -1,3-glucanasa en el medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT

Teniendo en cuenta que en los ensayos de microsecuenciación por nanoLC ESI MS/MS, descritos en el apartado anterior, se encontraron cinco fragmentos trípticos, uno inducible (Tabla 4.2) y cuatro constitutivos (Tabla 4.3), se procedió a la evaluación en el medio extracelular de la actividad endoquitinasa, ya que la mayoría de las quitinasas en plantas se incluyen dentro de las endoquitinasas que hidrolizan al azar polímeros de quitina. La endoquitinasa, junto con la enzima β -1,3-glucanasa, se consideran las dos principales hidrolasas antifúngicas presentes en plantas (Mauch et al., 1988; Sela-Buurlage et al., 1993), por lo que también se ensayó esta actividad empleando como sustratos, glicol quitina y laminarina, respectivamente (ver sección como VIII.2. de Materiales y Métodos).

En la Figura 4.22 se muestra el efecto de la adición de MJ y/o CDs sobre la actividad endoquitinasa extracelular. En los tratamientos control se registraron unos valores de actividad de $14,92 \pm 0,13 \mu\text{g NAcGlc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína y tras la adición de MJ se produjo un moderado incremento de actividad, siendo ésta 1,2 veces superior a la del control. La mayor actividad se encontró en los tratamientos con CDsH (1,5 veces superior al control) y con CDsH y MJ con un aumento de 1,7 veces superior al control, lo que equivale a $25,51 \pm 0,20 \mu\text{g NAcGlc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Por el contrario, la elicitación con CDsM y/o MJ produjo una disminución de la actividad endoquitinasa extracelular, aunque fue menos marcada en los tratamientos de elicitación combinados ($7,10 \pm 0,06$ y $9,67 \pm 0,05 \mu\text{g NAcGlc min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente).

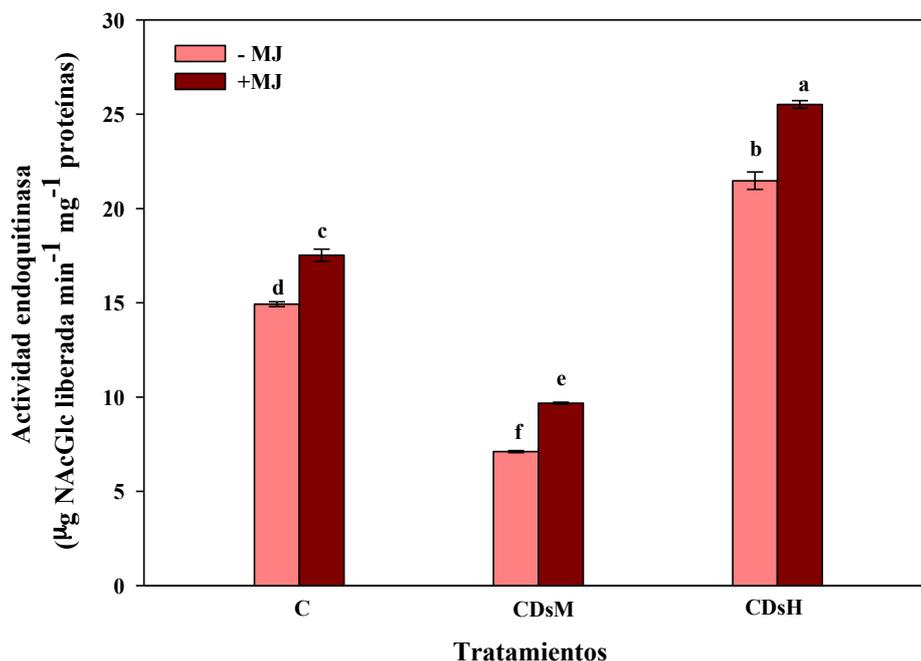


Figura 4.22. Actividad endoquitinasa en el medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicitadas con MJ (100 μ M) y/o CDs (50 mM). Los elicitores se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

En la Figura 4.23 se muestra la actividad β -1,3-glucanasa. En dicha figura se observa un comportamiento similar al descrito para la enzima endoquitinasa (Figura 4.22). Así, en los tratamientos control el valor de actividad fue de $1,57 \pm 0,06 \mu\text{g Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ y tras la adición de MJ se produjo un moderado incremento, siendo la actividad 1,3 veces superior a la del control. La mayor actividad se encontró en los tratamientos con CDsH (1,4 veces superior al control) y con CDsH+MJ, donde la actividad se duplicó con respecto al control ($3,21 \pm 0,05 \mu\text{g Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$). Por el contrario, la elicitación con CDsM produjo una disminución de la actividad β -1,3-glucanasa extracelular ($1,44 \pm 0,04 \mu\text{g Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$). Sin embargo, en el tratamiento combinado CDsM+MJ se produjo un incremento moderado de la actividad, con un valor de $1,77 \pm 0,02 \mu\text{g Glc min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$.

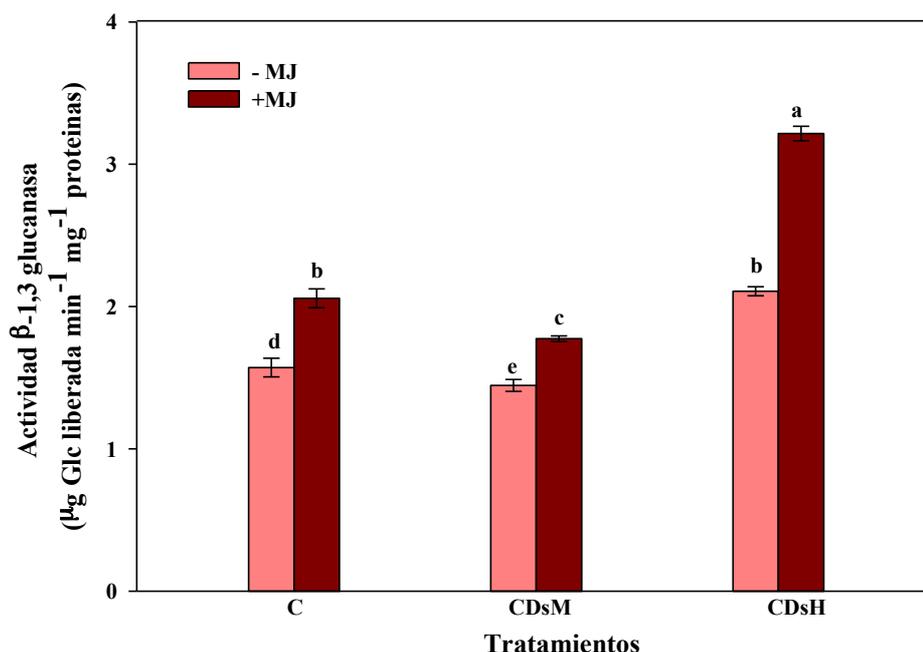


Figura 4.23. Actividad β -1,3-glucanasa en el medio extracelular de suspensiones celulares de tomate cv. MT elicidas con MJ (100 μ M) y/o CDs (50 mM). Los elicitors se añadieron al cultivo 10 días después de la inoculación. Las muestras se recogieron a los 14 días de la inoculación. Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm error estándar. Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0,05$).

De nuevo, estos resultados ponen de manifiesto que los tratamientos con MJ, con CDsH y, sobre todo, el uso combinado de elicitors incrementan de forma significativa las actividades endoquitinasa y β -1,3-glucanasa. Diferentes trabajos han puesto de manifiesto que estas enzimas se inducen en respuesta a diferentes elicitors y que forman parte de la respuesta de defensa de las plantas frente a distintos tipos de estrés (Benhamou, 1996; Zhao et al., 2005).

Diversos experimentos *in vitro* han demostrado que tanto las quitinasas como las β -1,3 glucanasas son capaces de degradar las paredes celulares de hongos patógenos, así como de inhibir el crecimiento del micelio o la germinación de esporas, y que, cuando ambas enzimas están presentes, aumenta de forma sinérgica su actividad antifúngica (Mauch et al., 1988; Sela-Buurlage et al., 1993; Van Loon y Van Strien, 1999; Van Loon et al., 2006). De acuerdo con su papel en las respuestas de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, estas enzimas se expresan en respuesta al daño mecánico (Wu y Bradford, 2003) y el JA y su metil

éster el MJ son componentes claves en las cascadas de transducción de señales desencadenadas por el estrés mecánico, por lo que la aplicación exógena de MJ induce la expresión de genes que codifican estas enzimas (Wu y Bradford, 2003). La inducción de estas enzimas tras la adición de MJ se ha descrito en suspensiones celulares procedentes de distintas especies (Repka et al., 2004; Novo Uzal et al., 2009; Sabater-Jara et al., 2010; Belchí-Navarro et al., 2013) y están en consonancia con lo descrito en este estudio.

Además de su papel en la defensa frente a patógenos, las β -1,3-glucanasas y las quitinasas están implicadas en diversas funciones fisiológicas relacionadas con el crecimiento y el desarrollo vegetales (Zhong et al., 2002; Wu y Bradford, 2003; Balasubramanian et al., 2012). Estas enzimas están codificadas por familias multigénicas y algunas de ellas se expresan de forma diferencial en función del tipo de patógeno o de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta (Van Loon y Van Strien, 1999). En este sentido, se puede sugerir que la presencia de estas enzimas en los tratamientos control de suspensiones celulares de MT estaría relacionada con el papel que desempeñan en los procesos de crecimiento; y el incremento en la actividad extracelular observado en los tratamientos elicitados con MJ y/o CDs podría considerarse como parte de las respuestas de defensa coordinadas inducidas por CDs y MJ.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la actividad de las enzimas peroxidasa, PAL, endoquitinasa y β -1,3-glucanasa ponen de manifiesto, de nuevo, que la naturaleza fisicoquímica de las CDs influye en su capacidad para formar complejos de inclusión y en su capacidad para inducir la expresión de estas enzimas.

5. Conclusiones

Conclusiones

1. Se han establecido cultivos celulares a partir de frutos inmaduros de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MT) y se ha caracterizado el crecimiento de las suspensiones celulares que mostraron un $VEC_{m\acute{a}x}$ del 78,9 %, una V_{exp} de 5,5 ml de suspensión celular/día y un T_a de 13 días.
2. Las suspensiones celulares presentaron una acumulación de compuestos fenólicos máxima durante la fase de crecimiento exponencial, tanto en el medio extracelular como en el intracelular, indicando que estos compuestos pueden estar implicados en los procesos de división celular. Entre los compuestos que se acumulan en esta fase se han identificado dos ácidos hidroxicinámicos: el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico.
3. Al final de la fase de crecimiento exponencial, se observaron los máximos niveles de β -sitosterol y de taraxasterol en el medio extracelular, si bien los máximos niveles del precursor del β -sitosterol, el isofucoesterol, se observaron en la fase de latencia (día 2), lo que sugiere que la mayor producción de β -sitosterol podría estar relacionada con los procesos de expansión celular, que requieren la síntesis de nuevos componentes de la membrana celular, entre ellos, los fitoesteroles. Por su parte, la detección de taraxasterol en el medio extracelular resulta sorprendente, ya que este compuesto es muy común en la cutícula de los frutos del tomate y en la bibliografía no se ha descrito su presencia en suspensiones celulares.
4. El patrón de proteínas totales en el medio celular fue complejo desde el inicio de la fase de latencia hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento de la suspensión celular. En la fracción extracelular, a los 2 días de cultivo se observa la presencia de una banda proteica de un peso molecular aparente de 46 kDa, que se mantiene a lo largo del cultivo y que podría corresponder a una isoforma de peroxidasa constitutiva de acuerdo con lo descrito en la bibliografía.
5. El patrón isoenzimático de peroxidasas del medio extracelular fue mucho más complejo que el del medio intracelular durante todo el periodo de cultivo de las suspensiones celulares. Los máximos niveles de actividad peroxidasa, determinados

con TMB y ácido clorogénico, coincidieron con la fase de crecimiento activa, lo que sugiere que estas enzimas pueden estar implicadas en los procesos de elongación celular. Además, el perfil de actividad peroxidasa fue similar al obtenido para los fenoles solubles totales y para el ácido cafeico durante el periodo de cultivo.

6. La elicitación de las suspensiones celulares con MJ y CDsM o CDsH, separadamente o en combinación, dio lugar a un aumento de los niveles de isofucoesterol, β -sitosterol y taraxasterol, si bien los mayores cambios se registraron en los tratamientos con CDsM. Por su parte, en los tratamientos combinados (CDs+MJ) no se observó un aumento significativo en los niveles de estos compuestos con respecto a los tratamientos con CDs. Sin embargo, los mayores niveles de fenoles solubles totales se obtuvieron con los tratamientos combinados, sobre todo con el tratamiento CDsM+MJ. Además, ambos elicitors (CDs+MJ) actuaron de forma sinérgica en la producción de ácido cafeico en el medio intracelular, indicando que la naturaleza fisicoquímica de las CDs influye en su capacidad para estimular la producción de metabolitos y para actuar como agentes secuestrantes.
7. En los tratamientos de elicitación también se observó, en general, una disminución de las actividades enzimáticas peroxidasa, PAL, endoquitinasa y β -1,3-glucanasa en los tratamientos en presencia de CDsM y un aumento de dichas actividades enzimáticas en presencia de CDsH, en los tratamientos con MJ y sobre todo en los combinados (CDs+MJ), lo que indica que las CDs y el MJ son capaces de regular la actividad de estas enzimas.
8. El análisis del proteoma extracelular de las suspensiones celulares mediante separación monodimensional en geles de poliacrilamida y microsecuenciación de fragmentos peptídicos en las suspensiones elicidadas con CDsM+MJ permitió la identificación de diez fragmentos trípticos cuyas secuencias de aminoácidos mostraron homología con varias proteínas PR de *S. lycopersicum*, quitinasas, una proteína asociada a la muerte celular biótica y una peroxidasa catiónica. Estas proteínas podrían formar parte de las respuestas de defensa en suspensiones celulares de tomate MT. Además de las proteínas inducidas en el tratamiento de elicitación, se

Conclusiones

identificaron una serie de proteínas constitutivas, como proteínas PR del tipo PR-1 y PR-5, endoquitinasas, quitinasas, peroxidasas, una proteína inhibidora de endoglucanasas fúngicas específicas de xiloglucano (XEGIP) y otras enzimas hidrolíticas implicadas en la ruptura de xilanos y arabinoxilanos como la LeXYL2 y la α -L-Arabinofuranosidasa, que pueden estar implicadas en la modificación de la arquitectura de la pared celular durante el crecimiento del cultivo.

6. Bibliografía

- Abe, I., Rohmer, M., & Prestwich, G. D.** (1993). Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.*, 93, 2189-2206.
- Achnine L., Blancaflor E. B., Ras Arch. Biochem. Biophys mussen S., & Dixon, R.A.** (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16, 3098–3109.
- Agarwal, S., & Rao, A. V.** (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can. Med. Assoc. J.*, 19, 739-744.
- Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Lebrun, M. H., Job, D., & Rakwal, R.** (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10, 799-827.
- Akashi, T., Furuno, T., Takahashi, T., & Ayabe, S. I.** (1994). Biosynthesis of triterpenoids in cultured cells, and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*, 36, 303-308.
- Akram, A., Ongena, M., Duby, F., Dommes, J., & Thonart, P.** (2008). Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol.*, 8, 113.
- Ali, M. B., Singh, N., Shohael, A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y.** (2006). Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Sci.*, 171, 147-154.
- Almagro, L.** (2011). Análisis funcional de la producción de compuestos con actividad antitumoral a partir de cultivos celulares sometidos a elicitación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Almagro, L., Bru, R., Pugin, A., & Pedreño, M. A.** (2012). Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant Physiol. Biochem.*, 51,1-9.
- Almagro, L., López-Pérez, A. J., & Pedreño, M. A.** (2011a). New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins. *Biotechnol. Lett.*, 33, 381-385.
- Almagro, L., Ros, L. G., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barceló, A. R., & Pedreño, M. A.** (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.*, 60, 377-390.
- Almagro, L., Sabater-Jara, A. B., Belchí-Navarro, S., Fernández-Pérez, F., Bru, R., & Pedreño, M. A.** (2011b). Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate. En: *Abiotic stress*. Hemanth KN, Vasanthaiiah MCA (Eds.). USA: In Tech., pp 115-136.
- Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., & Schuurink, R. C.** (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol.*, 135, 2025-2037.
- Aoki, K., Yano, K., Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda, K., et al.** (2010). Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics*, 11, 210-225.
- Appel, H. M.** (1993). Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.*, 19, 1521-1552.
- Ashour, M., Wink, M., & Gershenzon, J.** (2010) Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. En: *Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Wink, M. (Ed.). Chichester, UK: Wiley-Blackwell, pp 258-303.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N.** (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol. Lett.*, 34, 1983-1990.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., et al.** (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7608-7612.
- Bauer, S., Schulte, E., & Thier, H.P.** (2004a) Composition of the surface wax from tomatoes. I. Identification of the components by GC/MS. *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 223–228.

- Bauer, S., Schulte, E., & Thier, H.P.** (2004b) Composition of the surface wax from tomatoes. II. Quantification of the components at the ripe red stage and during ripening. *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 487–491.
- Belchí-Navarro, S.** (2012). Caracterización de la producción de resveratrol y análisis de proteínas en cultivos celulares de *Vitis vinifera* cv. Monastrell. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Belchí-Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R., & Pedreño, M. A.** (2012). Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Rep.*, 31(1), 81-89.
- Belchí-Navarro, S., Almagro, L., Sabater-Jara, A. B., Fernández-Pérez, F., Bru, R., & Pedreño, M. A.** (2013). Induction of *trans*-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv. Monastrell. *J. Plant Physiol.*, 170, 258-264.
- Belchí-Navarro, S., Pedreño, M. A., & Corchete, P.** (2011). Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell cultures treated with β -cyclodextrins. *Biotechnol. Lett.*, 33, 179-184.
- Benhamou, N.** (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 1, 233-240.
- Bestwick, C. S., Brown, I. R., & Mansfield, J. W.** (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.*, 118, 1067-1078.
- Bhat, R. A., & Panstruga, R.** (2005). Lipid rafts in plants. *Planta*, 223, 5-19.
- Binns, A. N., Chen, R. H., Wood, H. N., & Lynn, D. G.** (1987). Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 980-984.
- Bishop, G. J., Harrison, K., & Jones, J. D.** (1996). The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*, 8, 959-969.
- Bleeker, P. M., Spyropoulou, E. A., Diergaarde, P. J., Volpin, H., De Both, M. T., Zerbe, P., et al.** (2011). RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant Mol. Biol.*, 77, 323-336.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. F.** (1992). Fruit, vegetable and cancer prevention a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18, 1-29.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C., & Dixon, R. A.** (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.*, 122, 107-116.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., et al.** (2005). Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 5, 212-221.
- Boudet, A. M.** (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722-2735.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E.** (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.*, 161, 839-851.
- Boutté, Y., & Grebe, M.** (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, 705-713.
- Bovy, A., De Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., et al.** (2002). High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *Cl*. *Plant Cell*, 14, 2509-2526.
- Bovy, A., Schijlen, E., & Hall, R. D.** (2007). Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics*, 3, 399-412.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brenner, E. D., Lambert, K. N., Kaloshian, I., & Williamson, V. M.** (1998). Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol.*, 118, 237-247.

- Bru, R., Sellés, S., Casado-Vela, J., Belchí-Navarro, S., & Pedreño, M. A.** (2006). Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 65-71.
- Brunner, Y., Schwartz, D., Couté, Y., & Sanchez, J. C.** (2009). Proteomics of regulated secretory organelles. *Mass Spectrom. Rev.*, 28, 844-867.
- Buchel, A. S., & Linthorst, H. J. M.** (1999) PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta, S.K., Muthukrishnan S. (Eds). Florida, USA: CRC Press LLC, Boca Ratón, pp 21-48.
- Buschmann, H. J., & Schollmeyer, E.** (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 53, 185-192.
- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., & Smetanska, I.** (2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep.*, 31, 461-477.
- Calderón, A. A., García-Florenciano, E., Pedreño, M. A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A.** (1992a). The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Z. Naturforsch.*, 47, 215-221.
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., & Ros Barceló, A.** (1995). Peroxidase isoenzymes as markers of cell de-differentiation in grapevines (*Vitis vinifera*). *Vitis*, 34, 207-210.
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., Pedreño, M. A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A.** (1992b). Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in in vitro-cultured grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 29, 63-70.
- Campbell, M. M., & Ellis, B. E.** (1992). Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiol.*, 98, 62-70.
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., et al.** (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7, 18.
- Celik, S., Erdogan, S., & Tuzcu, M.** (2009). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.*, 60, 270-276.
- Chamorro, J.** (1995). Anatomía y fisiología de la planta de tomate. En: *El cultivo del tomate*. Nuez, F. (Ed.). Madrid : Ediciones Mundi-Prensa, pp 43-91.
- Chang, A., Lim, M. H., Lee, S. W., Robb, E. J., & Nazar, R. N.** (2008). Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. *J. Biol. Chem.*, 283, 33591-33601.
- Chao, P. C., Hsu, C. C., & Yin, M. C.** (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr. Metab. (Lond)*, 6, 33.
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., & Saunders, C.** (1995). Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol.*, 109, 1337-1343.
- Chen, H., Jones, A. D., & Howe, G. A.** (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Lett.*, 580, 2540-2546.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., & Chen, X. Y.** (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.*, 49, 179-186.
- Cheng, S. H., Sheen, J., Gerrish, C., & Bolwell, G. P.** (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.*, 503, 185-188.
- Cheong, J. J., & Choi, Y. D.** (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.*, 19, 409-413.
- Chibbar, R.N., Cella, R., & Van Huystee, R. B.** (1984). The heme moiety in peanut peroxidase. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 62, 1046-1050.

- Chivasa, S., Hamilton, J. M., Pringle, R. S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Lindsey, K., & Slabas, A. R. (2006). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *J. Exp. Bot.*, 57, 1553-1562.
- Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Robertson, D., Yu, X. L., Knox, J. P., et al. (2002). Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis*, 23, 1754-1765.
- Civello, P. M., Martínez, G. A., Chaves, A. R., & Añón, M. C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria annasa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2596-2601.
- Clarke, S. M., Cristescu, S. M., Miersch, O., Harren, F. J., Wasternack, C., & Mur, L. A. (2009). Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 182, 175-187.
- Clouse, S. D. (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*, 14, 1995-2000.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., & Vad, L. (1993). Plant chitinases. *Plant J.*, 3, 31-40.
- Colliver, S., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., De Vos C. H. R., et al. (2002). Improving the nutritional content of tomatoes through reprogramming their flavonoid biosynthetic pathway. *Phytochem. Rev.*, 1, 113-123.
- Córdoba-Pedregosa, M. C., Villalba, J. M., Córdoba, F., & González-Reyes, J. A. (2005). Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *J. Exp. Bot.*, 56, 685-694.
- Croteau, R. B., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B, Grissem, W & Jones, R. (Eds.). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp 1250-1268.
- Dan, Y., Yan, H., Munyikwa, T., Dong J., Zhang, Y., & Armstrong, C. L. (2006). Micro-Tom, a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep.*, 25, 432-441.
- Datta, K., & Muthukrishnan, S. (1999). Expression and function of PR-protein genes in transgenic plant. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.). Florida, USA: CRC Press LLC, Boca Raton, pp 261-277.
- Davies, J. N., & Hobson, G. E. (1996). The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 15, 205-279.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process. Biochem.*, 39, 1033-1046.
- Derckel, J. P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B., & Legendre, L. (1999). Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89, 197-203.
- Devarenne, T. P., Ghosh, A., & Chappell, J. (2002). Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiol.*, 129, 1095-1106.
- Devoto, A., & Turner, J. G. (2003). Regulation of jasmonate mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.*, 92, 329-337.
- Dixon, R. A. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. En: *Plant Cell Culture. A practical approach*. Dixon, R.A. (Ed.). IRL Press, Oxford, pp 1-20.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.*, 3, 371-390.
- Dong, J., Wan, G., & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *J. Biotechnol.*, 148, 99-104.
- Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B.E., Rojo-Dominguez, A., Whitaker, J.R., Arroyave-Hernández, C., & Regalado, C. (2003). Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. *Phytochemistry*, 62, 5-11.

- Dubey, V. S., Bhalla, R., & Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.*, 28, 637-646.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 369-382.
- Dunand, C., De Meyer, M., Crèvecoeur, M., & Penel, C. (2003). Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth. *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 805-811.
- Dupree, P. (1999). The golgi bypassed. *Trends Cell Biol.*, 9, 130.
- Durante, M., Caretto, S., Quarta, A., De Paolis, A., Nisi, R., & Mita, G. (2011). β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 1905-1913.
- Dusotoit-Coucaud, A., Brunel, N., Kongsawadworakul, P., Viboonjun, U., Lacoite, A., Julien, J. L., et al. (2009). Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Ann. Bot.*, 104, 635-647.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., & Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.*, 6, 78-84.
- Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M. H., & Bacher, A. (1997). Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Lett.*, 38, 3889-3892.
- El-Khalla, S. M. (2007). Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (Jasmonic acid & Salicylic acid): 2-Changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 1, 717-732.
- Ellis, J. G., Dodds, P. N., & Lawrence, G. J. (2007). The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10, 326-331.
- Enfissi, E., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.*, 3, 17-27.
- Esquinas-Alcázar, J., & Nuez, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: *El cultivo del tomate*. Nuez, F. (Ed.). Madrid, Barcelona: Mundi Prensa, pp 13-42.
- Expósito, O., Bonfill, M., Onrubia, M., Jané, A., Moyano, E., Cusidó, R. M., et al. (2009). Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures. *New Biotechnol.*, 25, 252-259.
- Fagoaga, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J. J., Arnau, J., et al. (2001). Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol. Breed.*, 7, 175-185.
- Falara, V., Akhtar, T. A., Nguyen, T. T., Spyropoulou, E. A., Bleeker, P. M., Schauvinhold, I., et al. (2011). The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol.*, 157, 770-789.
- FAOSTAT (Programa estadístico de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2012). En: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>. (Marzo 2014).
- Ferrer, M. A., Calderón, A. A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A. (1990). 4-Methoxy- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochem. Anal.*, 1, 63-69.
- Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., et al. (2011). Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *J. Exp. Bot.*, 62, 2841-2854.
- Flores-Sánchez, I. J., Ortega-López, J., del Carmen Montes-Horcasitas, M., & Ramos-Valdivia, A. C. (2002). Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant Cell Physiol.*, 43, 1502-1509.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int. J. Plant Gen.*, 1-52.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal*, 11, 861-905.

- Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., & Chapple, C.** (2002). The Arabidopsis *REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.*, 30, 33-45.
- Frenkel, M., Külheim, C., Jänkänpää, H., Skogström, O., Dall'Osto, L., Ågren, J., et al.** (2009). Improper excess light energy dissipation in Arabidopsis results in a metabolic reprogramming. *BMC Plant Biol.*, 9, 12.
- Fujita, N., Tanaka, E., & Murata, M.** (2006). Cinnamaldehyde inhibits phenylalanine ammonia-lyase and enzymatic browning of cut lettuce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 672.
- Fukuda, Y., & Shinshi, H.** (1994). Characterization of a novel cis-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol. Biol.*, 24, 485-493.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., et al.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19, 711-724.
- García-Florenciano, E., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., & Barceló, A. R.** (1991). The vacuolar localization of basic isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3-acetic acid catabolism. *Plant Growth Regul.*, 10, 125-138.
- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F. J., & Greppin, H.** (1985). A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.*, 64, 418-423.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., et al.** (2008). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1241-1250.
- Gazaryan, I. G., & Lagrimini, L. M.** (1995). Purification and unusual kinetic properties of tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry*, 41, 1029-1034.
- Gershenzon, J., & Engelbert, J. E.** (2010). Secondary metabolites and plant defense. En: *Plant Physiology*. L. Taiz, E. Zeiger (Eds.). Sinauer Associates Inc, Pub, Massachusetts, pp 370-396.
- Ghosh, R., & Chakrabarti, C.** (2008). Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta*, 228, 883-890.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., & Willett, W. C.** (2002). Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 391-398.
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A.** (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71, 1848-1864.
- Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J. R., & Cooper, R. M.** (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann. Bot.*, 94, 87-97.
- Gómez, P., Ferrer, M. A., Fernández-Trujillo, J. P., Calderón, A., Artés, F., Egea-Cortines, M., et al.** (2009). Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 89, 1543-1551.
- Goossens, A., Häkkinen, S. T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., et al.** (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 8595-8600.
- Grandmougin-Ferjani, A., Schuler-Muller, I., & Hartmann, M. A.** (1997). Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.*, 113, 163-174.
- Grebe, M., Xu, J., Möbius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, H. J., et al.** (2003). Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr. Biol.*, 13, 1378-1387.
- Griebel, T., & Zeier, J.** (2010). A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J.*, 63, 254-268.
- Grignon, C., & Sentenac, H.** (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 42, 103-128.

- Gülçin, İ.** (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 2389-2393.
- Hamberger, B., Ellis, M., Friedmann, M., de Azevedo Souza, C., Barbazuk, B., & Douglas, C. J.** (2007). Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the Populus lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families This article is one of a selection of papers published in the Special Issue on *Poplar Research in Canada*. *Botany*, 85, 1182-1201.
- Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M.** (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 47, 2023-2044.
- Harborne, J. B.** (1999). Classes and functions of secondary products from plants. En: *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Walton, N. J. & Brown, D. E. (Eds.), London: ICP, World Scientific, pp 1-26.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Haslam, R. P., Downie, A. L., Raveton, M., Gallardo, K., Job, D., Pallett, K. E., et al.** (2003). The assessment of enriched apoplast extracts using proteomic approaches. *Annals Applied Biol.*, 143, 81-91.
- Heidrich, E., Lorenz, G., & Schreier, P.** (1983). Ultrathin-layer isoelectric focusing of partially purified peroxidase from tomato fruit. *Food Chem.*, 10, 285-296.
- Heitz, T., Geoffroy P., Friting, B., & Legrand M** (1999). The PR-6 family: proteinase inhibitors in plant-microbe and plant-insect interactions. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta S.K., Muthukrishnan S. (Eds). Florida, USA: CRC Press LLC, Boca Ratón, pp131-156.
- Hemmerlin, A., Harwood, J. L., & Bach, T. J.** (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog. Lipid Res.*, 51, 95-148.
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., & Lauvergeat, V.** (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.*, 62, 2465-2483.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., & Legrand, M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 278, 95-103.
- Hou, W. C., Chen, Y. C., & Lin, Y. H.** (1998). Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var. Tainong 57). *Botan. Bull. Acad. Sinica*, 39, 93-97
- Huang, C. N., Cornejo, M. J., Bush, D. S., & Jones, R. L.** (1986). Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma*, 135, 80-87.
- Hunt, G. M., & Baker, E. A.** (1980). Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, 19, 1415-1419.
- Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., et al.** (2008a). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.*, 54, 949-962.
- Iijima, Y., Suda, K., Suzuki, T., Aoki, K., & Shibata, D.** (2008b). Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 77, 94-102.
- Ikeda, K., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Nishide, M., Suzuki, Y., Koyama, A. H., & Yamasaki, H.** (2011). Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int. J. Mol. Med.*, 28, 595.
- INFO (Instituto de Fomento Región de Murcia).** (2013). Los productos hortofrutícolas en la Región de Murcia. <http://www.institutofomentomurcia.es>. (Marzo 2014).
- Iriti M., Rossoni M., Borgo, M., Faoro, F.** (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4406-4413.
- James, J. T., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., & Dubery, I. A.** (2013). Metabolomic analysis of methyl jasmonate-induced triterpenoid production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 18, 4267-4281.

- Jen, J. J., Seo, A., & Flurkey, W. H.** (1980). Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.*, 45, 60-63.
- Jenkins, J. A.** (1948). The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.*, 2, 379-392.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., et al.** (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 280-291.
- Juge, N.** (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends Plant Sci.*, 11, 359-367.
- Jung, Y. H., Agrawal G. K., Rakwal, R., & Jwa, N. S.** (2008). Secretome: toward deciphering the secretory pathways and beyond. En: *Plant Proteomics. Agrawal G.K., Rakwal R. (Eds.). Technologies, Strategies, and Applications*, Wiley, Hoboken, NJ, pp 83– 90.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K., & Shibata, K.** (1990). Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena coleoptiles*—Their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiol. Plant.*, 78, 1-7.
- Kärkönen, A., & Koutaniemi, S.** (2010). Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *J. Integr. Plant Biol.*, 52, 176-185.
- Kasprzewska, A. N. N. A.** (2003). Plant chitinases-regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 8, 809-824.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T.** (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 299-328.
- Khan, W., Prithviraj, B., & Smith, D. L.** (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J. Plant Physiol.*, 160, 859-863.
- Kierszniowska, S., Seiwert, B., & Schulze, W. X.** (2009). Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- β -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 8, 612-623.
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., & Thiem, B.** (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiol. Plant.*, 34, 2425-2433.
- Kim, B. J., Gibson, D. M., & Shuler, M. L.** (2005). Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus sp.* suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnol. Prog.*, 21, 700-707.
- Kim, J. Y., & Hwang, B.K.** (2000). Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol. Plant.*, 108, 51-60.
- Kim, Y. H., & Yoo, Y. J.** (1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 531-535.
- Kongduang, D., Wungsintaweekul, J., & De-Eknamkul, W.** (2008). Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.*, 49, 4067–4072.
- Koukol, J., & Conn, E. E.** (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, 236, 2692-2698.
- Kramer, K.J., & Muthukrishnan, S.** (2005). Chitin metabolism in insects. En: *Comprehensive Molecular Insect Science. Biochemistry and Molecular Biology*. Gilbert L.I., Latrou K., Gill S. (Eds.). Oxford, UK: Elsevier Press, pp 111-144.
- Krylov, S. N., Krylova, S. M., Chebotarev, I. G., & Chebotareva, A. B.** (1994). Inhibition of enzymatic indole-3-acetic acid oxidation by phenols. *Phytochemistry.*, 36, 263-267.
- Krzyzanowska, J., Czubačka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A., & Oleszek, W.** (2012). The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 108, 73-81.

- Kusumawati, L., Imin, N., & Djordjevic, M. A.** (2008). Characterization of the secretome of suspension cultures of Medicago species reveals proteins important for defense and development. *J. Proteome Research*, 7, 4508-4520.
- Lagaert, S., Beliën, T., & Volckaert, G.** (2009). Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. En: *Seminars in Cell & Developmental Biology* (20:1064-1073), Academic Press.
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R.** (2006). Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1486-1496.
- Lagrimini, L. M., Joly, R. J., Dunlap, J. R., & Liu, T. T. Y.** (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Molec. Biol.*, 33, 887-895.
- Laloi, M., Perret, A. M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M. N., et al.** (2007). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.*, 143, 461-472.
- Larronde, F., Gaudillère, J. P., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J. M.** (2003). Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 63-66.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., & Cardinali, A.** (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry, Advances in Research*, India: Research Signpost, 661, 23-67.
- Lee-Parsons, C. W., & Ertürk, S.** (2005). Ajmalicine production in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on Ca²⁺ level. *Plant Cell Rep.*, 24, 677-682.
- Lee, M. H., Jeong, J. H., Seo, J. W., Shin, C. G., Kim, Y. S., In, J. G., et al.** (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol.*, 45, 976-984.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., & Vogg, G.** (2007). The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiol.*, 144, 1667-1679.
- Leubner-Metzger, G., & Meins, F.** (1999). Function and regulation of plant β -1,3-glucanase (PR-2). En: *Pathogenesis-related proteins in plant*. Datta S., Muthukrishnan S. (Eds.). Florida, USA: CRC Press LLC, Boca Raton, pp 49-47.
- Li, X., Bonawitz, N. D., Weng, J. K., & Chapple, C.** (2010). The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell*, 22, 1620-1632.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R., & Pedreño, M. A.** (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res. Notes*, 1, 132.
- Linnaeus, C.** (1753). *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweden, First Edition.
- Lippmann, R., Kaspar, S., Rutten, T., Melzer, M., Kumlehn, J., Matros, A., et al.** (2009). Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3012-3032.
- Liu, C. J., & Dixon, R. A.** (2001). Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell*, 13, 2643-2658.
- Liu, J. J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K.** (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep.*, 29, 419-436.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E.** (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, 85, 1017-1025.
- Lombardi-Crestana, S., M. Azevedo, D. S., Ferreira e Silva, G.F., Pino, L.E., Appezzato-da-Glória, B., et al.** (2012). The Tomato (*Solanum Lycopersicum* cv. Micro-Tom) Natural genetic

- variation Rg1 and the DELLA mutant procera control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *J. Exp. Bot.*, 63, 5689-5703.
- Long, S. R.** (1989). Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56, 203-214.
- López-Arnaldos, T., Ferrer, M. A., Calderón García, A. A., & Muñoz, R.** (2002). Changes in peroxidase activity and isoperoxidase pattern during strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus development. *J. Plant Physiol.*, 159, 429-435.
- López-Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M. A., & Calderón, A. A.** (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) callus culture. *Physiol. Plant.*, 113, 315-322.
- López-Nicolás, J. M., & García-Carmona, F.** (2008). Rapid, simple and sensitive determination of the apparent formation constants of *trans*-resveratrol complexes with natural cyclodextrins in aqueous medium using HPLC. *Food Chem.*, 109, 868-875.
- López-Nicolás, J. M., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F.** (1995). Use of soluble lipids' for biochemical processes: linoleic acid-cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions. *Biochem. J.*, 308, 151-154.
- López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Pérez-López, A. J., Barrachina, Á. C., & Cuadra-Crespo, P.** (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1135, 158-165.
- López-Orenes, A., Martínez-Moreno, J. M., Calderón, A. A., & Ferrer, M. A.** (2013). Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 113, 417-427.
- López-Serrano, M., Fernández, M. D., Pomar, F., Pedreño, M. A., & Ros Barceló, A.** (2004). *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J. Exp. Bot.*, 55, 423-431.
- López-Serrano, M., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A.** (1994). Aluminum mediated fosetyl-Al effects on peroxidase secreted from grapevine cells. *Environ. Exp. Bot.*, 24, 329-336.
- Loulakakis, K. A., & Roubelakis-Angelakis, K. A.** (2001) Nitrogen assimilation in grapevine. En: *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Roubelakis-Angelakis, K. A. (Ed). Springer Netherlands, pp 59- 85.
- Lucena, M. A., Romero-Aranda, R., Mercado, J. A., Cuartero, J., Valpuesta, V., & Quesada, M. A.** (2003). Structural and physiological changes in the roots of tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.*, 118, 422-429.
- Luthra, R., Dubey, V. S., & Kumar, S.** (1999). Is 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase the key regulatory enzyme in isoprenoid biosynthesis in higher plants. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, 21, 647-649.
- Ma, Z. Y., Yuan, Y. J., Wu, J. C., & Zeng, A. P.** (2002). Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. Mairei. *Biotechnol. Lett.*, 24, 573-577.
- Maeda, K., Kimura, S., Demura, T., Takeda, J., & Ozeki, Y.** (2005). DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (*DcPAL1*) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Mol. Biol.*, 59, 739-752.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).** (2012). Anuario de estadística. <http://www.magrama.gob.es>. (Marzo 2014).
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A. K., & Acharya, P.** (2013). Elicitor-Induced Defense Responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *Sci. World J.* doi:10.1155/2013/561056.
- Mandujano-Chávez, A., Schoenbeck, M. A., Ralston, L. F., Lozoya-Gloria, E., & Chappell, J.** (2000). Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 381, 285-294.

- Mangas, S., Bonfill, M., Osuna, L., Moyano, E., Tortoriello, J., Cusido, R. M., et al.** (2006). The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiática*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. *Phytochemistry*, 67, 2041-2049.
- Marangoni, A. G., Brown, E. D., Stanley, D. W., & Yada, R. Y.** (1989). Tomato peroxidase: rapid isolation and partial characterization. *J. Food Sci.*, 54, 1269-1271.
- Martí, C., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L.** (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J. Exp. Bot.*, 57, 2037-2047.
- Martin, D., Throll, D., Gershenzon, J., & Bohlmann, J.** (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, 129, 1003-1018.
- Martinez-Esteso, M. J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J. C., Pedreño, M. A., & Bru-Martínez, R.** (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *J. Proteomics*, 73, 331-341.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A.** (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.*, 82, 323-330.
- Mathews, H., Clendennen, S. K., Caldwell, C. G., Liu, X. L., Connors, K., Metheis, N., et al.** (2003). Activation tagging in a transcriptional regulator of anthocyanins biosynthesis, modification and transport. *Plant Cell*, 15, 1689-1703.
- Matkowski, A.** (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants—A review. *Biotechnol. Adv.*, 26, 548-560.
- Matsukura, C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T. et al.** (2008). Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato Micro-Tom. *Curr. Genomics.*, 9, 436-443.
- Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., & Donnelly, D. M.** (1997). Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry*, 45, 405-410.
- Mattila P., & Kumpulainen, J.** (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3660-3667.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., & Boller, T.** (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1, 3-glucanase. *Plant Physiol.*, 88, 936-942.
- McEldoon, J. P., & Dordick, J. S.** (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol. Prog.*, 12, 555-558.
- McGarvey, D. J., & Croteau, R.** (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1015.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., et al.** (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J.*, 12, 1465-1472.
- Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y. D., et al.** (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.*, 10, 237-244.
- Meyer, K., Cusumano, J. C., Somerville, C., & Chapple, C. C.** (1996). Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cy e catochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 6869-6874.
- Mika, A., & Lüthje, S.** (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.*, 132, 1489-1498.
- Mitchell, A. E., Hong, Y. J., Koh, E., Barrett, D. M., Bryan, D. E., Denison, R. F., et al.** (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6154-6159.
- Miziak, P., Zoń, J., Amrhein, N., & Gancarz, R.** (2007). Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: Substituted derivatives of 2-aminoindane-2-phosphonic acid and 1-aminobenzylphosphonic acid. *Phytochemistry*, 68, 407-415.
- Moco, S., Capanoglu, E., Tikunov, Y., Bino, R. J., Boyacioglu, D., Hall, R., et al.** (2007). Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, 58, 4131-4146.

- Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., et al.** (2006a). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.*, 141, 1205-1218.
- Moco, S., Tseng, L. H., Spraul, M., Chen, Z., & Vervoort, J.** (2006b). Building-up a comprehensive database of flavonoids based on nuclear magnetic resonance data. *Chromatographia*, 64, 503-508.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., et al.** (2004). Lipid rafts in higher plant cells purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 279, 36277-36286.
- Mora-Pale M., Sánchez-Rodríguez, S. P., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., & Koffas, M. A. G.** (2014). Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 25,86-94.
- Morales, M., Bru, R., García-Carmona, F., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A.** (1998). Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 53, 179-187.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B.** (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, 41, 457-500.
- Morel, G., & Wetmore, R. M.** (1951). Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, 38, 141-143.
- Mori, H., & Iwahashi, H.** (2009). Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under uva irradiation. *J. Clin. Biochem Nutr.*, 45, 49.
- Morrone, D., Hillwig, M., Mead, M., Lowry, L., Fulton, D., & Peters, R.** (2011). Evident and latent plasticity across the rice diterpene synthase family with potential implications for the evolution of diterpenoid metabolism in the cereals. *Biochem. J.*, 435, 589-595.
- Muir, S. R., Collins, G. J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., de Vos, C. H. R., et al.** (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat. Biotechnol.*, 19, 470-474.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nakamura, N., & Horikoshi, K.** (1977). Production of schardinger β -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus sp.* *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 87-99.
- Narita, H., Asaka, Y., Ikura, K., Matsumoto, S., & Sasaki, R.** (1995). Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells. *Eur. J. Biochem.*, 228, 855-862.
- Negrel, J., & Javelle, F.** (1995). Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or pronase elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol. Plant.*, 95, 569-574.
- Neilson, E. H., Goodger, J. Q., Woodrow, I. E., & Møller, B. L.** (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends Plant Sci.*, 18, 250-258.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 369-389.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., et al.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiol.*, 108, 17-27.
- Niggeweg, R., Michael, A. J., & Martin, C.** (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.*, 22, 746-754.
- Novo Uzal, E., Gómez-Ros, L. V., Hernández, J. A., Pedreño, M. A., Cuello, J., & Ros Barceló, A.** (2009). Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. *J. Plant Physiol.*, 166, 831-843.
- Nuez, F., Prohens, J., & Blanca, J. M.** (2004). Relationships, origin and diversity of galápagos tomatoes: implications for the conservation of natural populations. *Am. J. Bot.*, 91, 86-99.

- Ogata, A., Tsuruga, A., Matsuno, M., & Mizukami, H. (2004). Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. *Plant Biotechnol.*, 21, 393-396.
- Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.*, 9, 433-440.
- Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M., & Lillo, C. (2008). Differential expression of the four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *J. Plant Physiol.*, 165, 1491-1499.
- Pajot, E., Daniel, L. C., & Silué, D. (2001). Phytogard® and DL- β -amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *Eur. J. Plant Pathol.*, 107, 861-869.
- Parr, A. J., & Bolwell, U. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 985-1012.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.*, 24, 255-265.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004a). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65, 1879-1893.
- Passardi, F., Penel, C., & Dunand, C. (2004b). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.*, 9, 534-540.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., et al. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 1380-1385.
- Peng, Y., Zhang, Y., & Ye, J. (2008). Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1838-1844.
- Perrone, S. T., McDonald, K. L., Sutherland, M. W., & Guest, D. I. (2003). Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 62, 127-135.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., & Delattre, L. (2007). Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int. J. Pharm.*, 338, 35-42.
- Pignocchi, C., Kiddle, G., Hernández, I., Foster, S. J., Asensi, A., Taybi, T., et al. (2006). Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol.*, 141, 423-435.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A. M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 939-966.
- Piñol, M. T., Palazón, J., & Cusidó, R. M. (2008). Introducción al metabolismo secundario. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds.). McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, SAU, pp 323-348.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., et al. (1998). The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*, 125, 1979-1989.
- Pomar, F., Bernal, M. A., Díaz, J., & Merino F. (1997). Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313-1317.
- Popper, Z. A. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11, 286-292.

- Posé D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Tacconnat, L., et al.** (2009). Identification of the Arabidopsis dry2/sqel-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J.*, 59, 63-76.
- Pratt, D. E., & Hudson, B. J.** (1990). Natural antioxidants not exploited commercially. En: *Food antioxidants*. Hudson B.J.F. (Ed.). Netherlands, Springer, pp 171-191.
- Pressey, R.** (1997). Two isoforms of NP24: a thaumatin-like protein in tomato fruit. *Phytochemistry*, 44, 1241-1245.
- Qiao, J. J., Yuan, Y. J., Zhao, H., Wu, J. C., & Zeng, A. P.** (2003). Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* co-treated with salicylic acid and hydrogen peroxide. *Biotechnol. Lett.*, 25, 387-390.
- Qin, Q., Bergmann, C. W., Rose, J. K. C., Saladie, M., Kumar Kolli, V. S., Albertsheim, B., et al.** (2003). Characterisation of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *Plant J.*, 34, 327-338.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T.** (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. App. Biochem.*, 37, 91-102.
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., Retana, S. G., Boubekour, T., et al.** (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*, 21, 1541-1555.
- Ragab, A. S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J. H., & Bobzin, S. C.** (2006). Detection and Quantitation of Resveratrol in Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7175-7179.
- Rajendra-Prasad, N. R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B. V.** (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol. Cell Biochem.*, 349, 11-19.
- Ralph, J., Helm, R. F., Quideau, S., & Hatfield, R. D.** (1992). Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 2961-2969.
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A.** (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20, 101-153.
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A.** (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.*, 6, 1720-1731.
- Rasmussen, S., & Dixon, R. A.** (1999). Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*, 11, 1537-1551.
- Ray, R. C., El Sheikha, A. F., Panda, S. H., & Montet, D.** (2011). Anti-oxidant properties and other functional attributes of tomato: An overview. *Int. J. Food Ferm. Technol.*, 1, 139-148.
- Redolfi, P.** (1983). Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. *Netherlands J. Plant Pathol.*, 89, 245-254.
- Reina-Pinto, J. J., & Yephremov, A.** (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.*, 47, 540-549.
- Rep, M., Dekker, H. L., Vossen, J. H., de Boer, A. D., Houterman, P. M., Speijer, D., et al.** (2002). Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.*, 130, 904-917.
- Repka, V., Fischerova, I., & Šilhárová, K.** (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biol. Plantarum*, 48, 273-283.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 2, 152-159.
- Rick, C. M.** (1976). *Tomato*. En: Evolution of crops plants. Simmonds, N.W. (Ed.). Longman. London & New York, pp 262-273.
- Rick, C. M.** (1991). Tomato resources of South America reveal many genetic treasures. *Diversity*, 7, 54-56.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W.** (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66, 401-436.

- Roberts, S. C.** (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.*, 3, 387-395.
- Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., et al.** (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J.*, 22, 3980-3991.
- Rodrigo, I., Vera, P., Tornero, P., Hernández-Yago, J., & Conejero, V.** (1993). cDNA Cloning of Viroid-Induced Tomato Pathogenesis-Related Protein P23 (Characterization as a Vacuolar Antifungal Factor). *Plant Physiol.*, 102, 939-945.
- Rodríguez-Concepción M.** (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem. Rev.*, 5, 1-15.
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, 130, 1079-1089.
- Rodwell, V. W., Beach, M. J., Bischoff, K. M., Bochar, D. A., Darnay, B. G., Friesen, J. A., et al.** (2000). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Meth. Enzymol.*, 324, 259-280
- Ros Barceló, A. R.** (1998). Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann. Bot.*, 82, 97-103.
- Ros Barceló, A. R., Muñoz, R., & Sabater, F.** (1987). Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell Wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.*, 71, 448-454.
- Ros Barceló, A., & Muñoz, R.** (1989). Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in Lupinus. *Phytochemistry*, 28, 1331-1333.
- Ros Barceló, A., Ferrer, M. A., García Florenciano, E., & Munoz, R.** (1991). The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pI in Lupinus. *Botan. Acta*, 104, 272-278.
- Ros Barceló, A., Gómez Ros, L. V., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J. S., et al.** (2003). Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Rev.*, 3, 1-18.
- Ros Barceló, A., Morales, M., & Pedreño, M. A.** (1998). Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. *ACS Symp. Ser.*, 697: 84-95.
- Rose, J. K., Bashir, S., Giovannoni, J. J., Jahn, M. M., & Saravanan, R. S.** (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.*, 39, 715-733.
- Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E.** (2013). Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*, 3, 33-52.
- Sabater-Jara, A. B., & Pedreño, M. A.** (2013). Use of β -cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 114, 249-258.
- Sabater-Jara, A. B., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Ferrer, M. A., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A.** (2010). Induction of sesquiterpenes, phytoesters and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annuum*. *J. Plant Physiol.*, 167, 1273-1281.
- Sabater-Jara, A. B., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Esteso, M. J., Youssef, S. M., Casado-Vela, J., et al.** (2014). Suspension-cultured plant cells as a tool to analyze the extracellular proteome. En: *Plant Proteomics*. Humana Press, pp 407-433.
- Sabater-Jara, A. B., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Ros Barceló, A., & Pedreño M. A.** (2011). Methyl jasmonate induces extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Capsicum chinense*. *Plant Signal. Behav.*, 6, 440-442.
- Sánchez-Romero, C., García-Gómez, M. L., Pliego-Alfaro, F., & Heredia, A.** (1994). Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol. Plant.*, 92, 97-101.
- Sánchez-Romero, C., García-Gómez, M. L., Pliego-Alfaro, F., & Heredia A.** (1995). One-step purification of an avocado peroxidase. *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 531-537.
- Sánchez-Sampedro, M. A., Fernández-Tárrago, J., & Corchete, P.** (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J. Biotechnol.*, 119, 60-69.

- Schaller, H.** (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 42, 465-476.
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., & Lichtenthaler, H. K.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 455, 140-144.
- Scott, J. W., & Harbaugh, B. K.** (1989). Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. *Florida Agric. Exp. Stn. Circ.*, 370, 1-6.
- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Vloemans, S. A., Melchers, L. S., Van den Elzen, P. J. M., & Cornelissen, B. J. C.** (1993). Only specific chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.*, 101, 857-863.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B., & De Bolle, M. F.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 941-950.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., et al.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 4788-4793.
- Sgarbi, E., Baroni Fornasiero, R., Paulino Lins, A., & Medeghini Bonatti, P.** (2003). Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Sci.*, 165, 951-957.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850-858.
- Sircar, D., & Mitra, A.** (2008). Evidence for *p*-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.*, 165, 407-414.
- Sircar, D., Roychowdhury, A., & Mitra, A.** (2007). Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.*, 164, 1358-1366.
- Sivakumar, G., & Paek, K. Y.** (2005). Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. *Chem. Nat. Comp.*, 41, 669-673.
- Slimestad, R., & Verheul, M.** (2009). Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *J. Sci. Food Agric.*, 89, 1255-1270.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T.** (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, 579, 200-213.
- Souter, M. A., Pullen, M. L., Topping, J. F., Zhang, X., & Lindsey, K.** (2004). Rescue of defective auxin-mediated gene expression and root meristem function by inhibition of ethylene signalling in sterol biosynthesis mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, 219, 773-783.
- Souter, M., Topping, J., Pullen, M., Friml, J., Palme, K., Hackett, R., et al.** (2002). Hydra mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 14, 1017-1031.
- Spooner, D. M., Anderson, G. J., & Jansen, R. K.** (1993). Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *Am. J. Bot.*, 80, 676-688
- Stafford, H. A.** (1974). Possible multienzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Adv. Phytochem.*, 8, 53-79.
- Steward, N., Martin, R., Engasser, J. M., & Goergen, J. L.** (1999) A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant. Cell Rep.*, 19, 171-176.
- Stewart, A. J., Chapman, W., Jenkins, G. I., Graham, I., Martin, T., & Crozier, A.** (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.*, 24, 1189-1197.
- Stonier, T.** (1972). The role of auxin protectors in autonomous growth. *La culture des tissus des plantes*, 193, 775-783.
- Stubberfield, L. C. F., & Shaw, P. J.A.** (1990) A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *J. Microb. Met.*, 12, 151-162.

- Sudha, G., & Ravishankar, G. A.** (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Curr. Sci.*, 85, 1212-1216.
- Suresh, B., Rajasekaran, T., Ramachandra Rao, S., Raghavarao, K. S. M. S., & Ravishankar, G. A.** (2001). Studies on osmolarity, conductivity and mass transfer for selection of a bioreactor for *Tagetes patula* L. hairy roots. *Proc. Biochem.*, 36, 987-993.
- Svobodová, A., Psotova, J., & Walterová, D.** (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 147, 137-45.
- Szabo, E., Thelen, A., & Petersen, M.** (1999). Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep.*, 18, 485-489.
- Szakiel, A., Pączkowski, C., Pensec, F., & Bertsch, C.** (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochem. Rev.*, 1, 22-55.
- Szejtli, J.** (2004). Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.*, 76, 1825-1845.
- Szente, L., & Szejtli, J.** (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 137-142.
- Taiz, L., & Zeiger, E.** (2010). *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Pub. Sunderland, Massachusetts
- Takahama, U.** (1998). Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol.*, 39, 681-689.
- Takahama, U., & Egashira, T.** (1990). Hydrogen peroxide-dependent oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine in vacuoles of mesophyll cells of *Vicia faba* L. Participation of peroxidase in the oxidation. *Plant Cell Physiol.*, 31, 539-544.
- Takahashi, H., Shimizu, A., Arie, T., Rosmalawati, S., Fukushima, S., Kikuchi, M., et al.** (2005). Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71, 8-22.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C. F., et al.** (1998). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 10, 1801-1816.
- Tams, J. W., & Welinder, K. G.** (1995). Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal. Biochem.*, 228, 48-55.
- Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A. J., Perry, B., & Bagni, N.** (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.*, 166, 895-905.
- Teutonico, R. A., Dudley, M. W., Orr, J. D., Lynn, D. G., & Binns, A. N.** (1991). Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 97, 288-297.
- Thorpe, T. A.** (1980). Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects [Higher plants, root-shoot primordium formation]. *Int. Rev. Cytol.*, 11: 71-112.
- Thorpe, T. A., Stasolla, C., Yeung, E. C., Klerk, G. D., Roberts, A. V., George, E. F., et al.** (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Effects, and Support Systems. En: *Plant propagation by tissue culture*. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (Eds.). Springer Netherlands, pp 115-174.
- Tornero, P., Conejero, V., & Vera, P.** (1994). A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol. Gen. Genet.*, 243, 47-53.
- Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., & Schröder, J.** (1995). Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (Stilbene and Chalcone Synthase). *J. Biol. Chem.*, 270, 7922-7928.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1-40.
- van der Rest, B., Danoun, S., Boudet, A. M., & Rochange, S.** (2006). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J. Exp. Bot.*, 57, 1399-1411.

- Van Loon, L. C., & Van Kammen, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40, 199-211.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85-97.
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Vera, P., & Conejero, V.** (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.*, 87, 58-63.
- Verhoeyen, M. E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C. H. R., et al.** (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.*, 53, 2099-2106.
- Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G., & Macri, F.** (1997). Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *J. Plant Physiol.*, 150, 573-577.
- Vögeli, U., Meins Jr, F., & Boller, T.** (1988). Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta*, 174, 364-372.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant*, 3, 2-20.
- Volpert, R., Osswald, W., & Elstner, E. F.** (1995). Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*, 38, 19-22.
- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W.** (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 64, 665-700.
- Wagley, L. M., Gladfelter, H. J., & Phillips, G. C.** (1987). De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Medw. in vitro. *Plant Cell Rep.*, 6, 167-171.
- Wakabayashi, K., Hoson, T., & Kamisaka, S.** (1997). Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. *Plant Physiol.*, 113, 967-973.
- Waldron, K. W., Parr, A. J., Ng, A., & Ralph, J.** (1996). Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.*, 7, 305-312.
- Wang, C., Wu, J., & Mei, X.** (2001). Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *App. Microb. Biotechnol.*, 55, 404-410.
- Wang, H., Nagegowda, D. A., Rawat, R., Bouvier Navé, P., Guo, D., Bach, T. J., et al.** (2012). Overexpression of *Brassica juncea* wild type and mutant HMG-CoA synthase 1 in Arabidopsis up regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.*, 10, 31-42.
- Wang, Z., Guhling, O., Yao, R., Li, F., Yeats, T. H., Rose, J. K., & Jetter, R.** (2011). Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids. *Plant Physiol.*, 155, 540-552.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.*, 100, 681-697.
- Wasternack, C., & Hause, B.** (2013). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. an update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann. Bot.*, 111, 1021-1058.
- Watson, B. S., Lei, Z., Dixon, R. A., & Sumner, L. W.** (2004). Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry*, 65, 1709-1720.
- Weiss, M., Schmidt, J., Neumann, D., Wray, V., Christ, R., & Strack, D.** (1999). Phenylpropanoids in mycorrhizas of the Pinaceae. *Planta*, 208, 491-502.
- Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjærsgård, I. V., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., & Duroux, L.** (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 269, 6063-6081.
- Weng, J. K., & Chapple, C.** (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.*, 187, 273-285.

- Willcox, J. K., Catignani, G. L. & Lazarus, S.** (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 1-18.
- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van den Toorn, A., Palme, K., & Scheres, B.** (2003). Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, 15, 612-625.
- Willits, M. G., Kramer, C. M., Prata, R. T., De Luca, V., Potter, B. G., Steffens, J. C., & Graser, G.** (2005). Utilization of the genetic resources of wild species to create a nontransgenic high flavonoid tomato. *J. Agric. Food Chem.*, 53(4), 1231-1236.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Plant.*, 107, 142-149.
- Winkel-Shirley, B.** (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 218-223.
- Wu, C. T., & Bradford, K. J.** (2003). Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiol.*, 133, 263-273.
- Wu, J., & Ho, K. P.** (1999). Assessment of various carbon sources and nutrient feeding strategies for *Panax ginseng* cell culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 82, 17-26.
- Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C. B., & Frenkel, K.** (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett.*, 308, 43-53.
- Wu, W. W., Wang, G., Baek, S. J., & Shen, R. F.** (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF. *J. Proteome Res.*, 5, 651-658.
- Xu, R., Fazio, G. C., & Matsuda, S.** (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. Y.** (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.*, 170, 853-858.
- Yuan, Y. J., Ma, Z. Y., Wu, J. C., & Zeng, A. P.** (2002). Taxol-induced apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Lett.*, 24, 615-618.
- Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., et al.** (2009). Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics*, 10, 363-337.
- Zamboni, A., Vrhovsek, U., Kassemeyer, H. H., Mattivi, F., & Velasco, R.** (2006). Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis spp.*). *Vitis*, 45, 63-68.
- Zapata, J. M., Salinas, C., Calderón, A. A., Muñoz, R., & Ros Barceló, A.** (1991). Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by the KCN-insensitive, salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. *Plant Cell Rep.*, 10, 579-582.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., & Franco, C.** (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci.*, 162, 459-468.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R.** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 23, 283-333.
- Zhao, J., Zhu, W. H., Hu, Q., & He, X. W.** (2000). Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol. Lett.*, 22, 1221-1226.
- Zheng, Z., & Wu, M.** (2004). Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Sci.*, 166, 507-514.
- Zhong, R., Kays, S. J., Schroeder, B. P., & Ye, Z. H.** (2002). Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell*, 14, 165-179.

- Zhu, B., Chen, T. H., & Li, P. H.** (1995). Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiol.*, 108, 929-937.
- Zhu, J., Chen, S., Alvarez, S., Asirvatham, V. S., Schachtman, D. P., Wu, Y., & Sharp, R. E.** (2006). Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol.* 140, 311-325.
- Zia, M. A., Rehman, K., Saeed, M. K., Ahmed, A., & Ghaffar, A.** (2001). Partial purification of peroxidase from tomato. *Sciences*, 1, 404-406.
- Zidovetzki, R., & Levitan, I.** (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 1311-1324.

