



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización de la producción de compuestos bioactivos y análisis de proteínas en cultivos celulares de brócoli

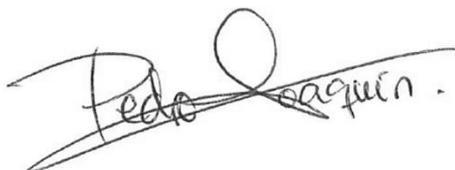
D. Pedro Joaquín Sánchez Pujante
2020

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección de la Dra. M^a Ángeles Pedreño García y la codirección de la Dra. Lorena Almagro Romero.

Este trabajo de investigación ha sido financiado con la ayuda de un contrato concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (PEJ-2014-A-79457), así como por el Programa de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (19876/GERM/15).

Firmado por PEDREÑO GARCIA
MARIA ANGELES - 22947266M el
día 28/05/2020 con un
certificado emitido por AC

Fdo: M^a Ángeles Pedreño García



Fdo: Pedro Joaquín Sánchez Pujante

ALMAGRO
ROMERO LORENA
- 48505730H

Firmado digitalmente
por ALMAGRO ROMERO
LORENA - 48505730H
Fecha: 2020.05.28
12:34:09 +02'00'

Fdo: Lorena Almagro Romero

Murcia, 28 de mayo de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, M^a Ángeles y Lorena, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y depositar su confianza en mí desde el principio. También quiero dar las gracias a toda el Área de Fisiología Vegetal, por permitirme trabajar en sus laboratorios y contribuir en los primeros años de mi formación como investigador.

A mis compañeros de laboratorio con los que he trabajado durante esta etapa, simplemente quiero decirles que esta tesis no hubiera sido posible sin su ayuda. Gracias a Sarai, por todos los momentos de risas y *frikismo* vividos y toda la alegría que, aunque ella no lo crea, aporta en cualquier lugar. Gracias a Ana, por estar siempre dispuesta, ya sea para echarme una mano cuando vas hasta el cuello o para tomarte un refrigerio en la cafetería. Gracias a Pedro, por su gran simpatía y por todo lo que me ha enseñado durante la tesis. Me siento muy “agradecido y emocionado” con mi compañera María, con quien comparto el mismo sentido del humor, el gusto por la Historia de España y hasta el amor hacia una palmera que una vez fue pequeña y vivió en un tarro de cristal. Gracias también a Pepita, por evitar el caos en el laboratorio y optimizar el trabajo creando el ambiente musical perfecto con maravillosas emisoras de radio.

Quiero dar las gracias por toda la ayuda que ha supuesto en la realización de la tesis al personal del CAID (M^a del Mar, Almudena, César y Alejandro) y del SACE (Pepe, Isabel, M^a José, Juana y Manoli). Gracias al Departamento de Genética, especialmente a Maribel y Carlos, que siempre están dispuestos a ayudarme con su infinita sabiduría. También quiero agradecer a todo el grupo de Calidad Alimentaria del IMIDA, especialmente a Pilar Flores, Pilar Hellín e Inma, porque colaborar con ellas ha sido un placer.

No me olvido de toda la gente que ha pasado por el laboratorio en todos estos años. Quiero dar las gracias a Esther, por toda su ayuda y sus consejos desde el primer momento que la conocí, además de tantos recuerdos que comparto con ella. Gracias a Bego, que es una compañera inmejorable capaz de hacer arte a partir de la ciencia. Gracias también a gente maravillosa como Fran, Liber o Pascual, con los que pasé muy buenos ratos de risas en el laboratorio.

Gracias a los siempre dispuestos alumnos internos y de TFG/TFM, especialmente, quiero destacar los buenos momentos vividos con Polina, Miguel, Marina y Alicia.

Tampoco me olvido de los estudiantes de intercambio que han pasado por el laboratorio y de los que siempre aprendo algo nuevo. Gracias a Cem, por ser el alma de la fiesta. Gracias a Laura, por su gran corazón y su generosidad. Gracias a Matteo, por ser tan buen compañero y por todos los momentos compartidos. Gracias a Cecilia, por estar siempre sonriendo.

Gracias también a las buenísimas personas con las que trabajo actualmente, por hacer que el día a día merezca la pena y por su continua motivación durante la redacción de la tesis.

Gracias a mi familia y sobre todo a mis padres, porque siempre insistieron en que hiciera la tesis doctoral y me han ayudado apoyándome para que todo fuera posible.

Gracias a todas mis amigas y amigos, por los momentos de desconexión tan necesarios y que me han empujado a seguir adelante con la tesis. Gracias a aquellas personas que la Biología puso en mi camino y, hoy en día, son gran parte de mi vida. Gracias también a mi grupo de amigas de toda la vida, a las que viven cerca y a las que viven lejos, porque cuando conseguimos juntarnos nos olvidamos de todo y cualquier excusa es buena para reír.

Por último, pero no por ello menos importante, gracias a Luis por su incondicional apoyo durante esta etapa. Gracias por soportarme en los malos momentos del confinamiento y la redacción de la tesis. Gracias también por estar ahí en los buenos momentos, celebrando conmigo cada pequeño logro, consiguiendo ser una parte fundamental de mi tesis doctoral.

A mi prima Isa

A mi tío Pedro

A mis abuelos

“I want the good life, but I don’t want an easy ride”

Madonna

PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

- Publicaciones recogidas en el JCR:

Autores (p. o. de firma): L. Almagro, P. García Pérez, S. Belchí Navarro, P. J. Sánchez Pujante y M. A. Pedreño

Título: New strategies for the use of *Linum usitatissimum* cell factories for the production of bioactive compounds

Revista: *Plant Physiology and Biochemistry*

Clave: A Volumen: 99 Páginas, inicial: 73 final: 78 Fecha: 2016

Lugar de publicación: Países Bajos

Autores (p. o. de firma): P. J. Sánchez Pujante, B. Miras Moreno, P. Soluyanova, V. Garre, M. A. Pedreño y L. Almagro

Título: Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*

Revista: *Mycological progress*

Clave: A Volumen: 16 Páginas, inicial: 507 final: 512 Fecha: 2017

Lugar de publicación: Alemania

Autores (p. o. de firma): P. J. Sánchez Pujante, M. Borja Martínez, M. A. Pedreño y L. Almagro

Título: Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures
Revista: *Planta*

Clave: R Volumen: 246 Páginas, inicial: 19 final: 32 Fecha: 2017

Lugar de publicación: Alemania

Autores (p. o. de firma): P. J. Sánchez Pujante, A. B. Sabater Jara, S. Belchí Navarro, M. A. Pedreño y L. Almagro

Título: Increased glucosinolate production in *Brassica oleracea* var. *italica* cell cultures due to coronatine activated genes involved in glucosinolate biosynthesis

Revista: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Clave: A Volumen: 67 Páginas, inicial: 102 final: 111 Fecha: 2018

Lugar de publicación: EEUU

Autores (p. o. de firma): P. J. Sánchez Pujante, M. Gionfriddo, A. B. Sabater Jara, L. Almagro, M. A. Pedreño y P. Díaz Vivancos

Título: Enhanced bioactive compound production in broccoli cells due to coronatine and methyl jasmonate is linked to antioxidative metabolism

Revista: *Journal of Plant Physiology*

Clave: A Volumen: 248 Página: 153136

Fecha: 2020

Lugar de publicación: Países Bajos

- Patentes:

Autores (p. o. de firma): A. B. Sabater Jara, P. J. Sánchez Pujante, M. Borja Martínez y M. A. Pedreño

Título: Procedimiento para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos celulares

Entidad titular de derechos: Agrícola Santa Eulalia, S.L. y Universidad de Murcia

Nº de solicitud: P201730836

País de inscripción: España

Fecha de registro: 23/06/2017

- Congresos nacionales e internacionales:

Título del trabajo: Production of phytosterols and tocopherols from elicited *Linum usitatissimum* cell cultures

Nombre del congreso: XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España

Fecha de celebración: 14/06/2015

Fecha de finalización: 17/06/2015

Entidad organizadora: Sociedad Española de Fisiología Vegetal

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Polina Soluyanova; Pascual García Pérez; Begoña Miras Moreno; Libertad Raquel Tudela Sánchez; Lorena Almagro; María Ángeles Pedreño.

Publicaciones durante el desarrollo de la tesis

Título del trabajo: New strategies for the use of grapevine cell factories for the production of *trans*-resveratrol

Nombre del congreso: Resveratrol 2015

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Dijon, Francia

Fecha de celebración: 02/11/2015

Fecha de finalización: 03/11/2015

Autores (p. o. de firma): Lorena Almagro; Sarai Belchí Navarro; Begoña Miras Moreno; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Ascensión Martínez Márquez; Consuelo Riquelme Riquelme; Roque Bru; María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Effect of elicitors on the production of antioxidant compounds and redox proteins in broccoli cell cultures

Nombre del congreso: 2nd International Conference on Nutraceuticals and Nutrition Supplements

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Bangkok, Tailandia

Fecha de celebración: 18/07/2016

Fecha de finalización: 20/07/2016

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Lorena Almagro; María Borja; Sarai Belchí Navarro; Ana Jiménez; Francisca Sevilla; María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Bioproduction of bioactive compounds obtained from elicited broccoli cell cultures

Nombre del congreso: 2nd International Conference on Nutraceuticals and Nutrition Supplements

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Bangkok, Tailandia

Fecha de celebración: 18/07/2016

Fecha de finalización: 20/07/2016

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Borja; Sarai Belchí Navarro; Juan Francisco Sánchez López; María Ángeles Pedreño; Lorena Almagro.

Título del trabajo: Producción de compuestos bioactivos en cultivos celulares de *Brassica oleracea* var. *Italica*

Nombre del congreso: III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 30/05/2017

Fecha de finalización: 01/06/2017

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Ana Belén Sabater Jara; María Borja Martínez; Pilar Hellín; Pilar Flores; Lorena Almagro Romero; María Ángeles Pedreño García.

Título del trabajo: Production of phytosterols in *Helianthus annuus* elicited cell cultures

Nombre del congreso: Biotec 2017

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 18/06/2017

Fecha de finalización: 21/06/2017

Autores (p. o. de firma): Libertad Raquel Tudela Sánchez; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Begoña Miras Moreno; Laura Di Patria; María Ángeles Pedreño García; Ana Belén Sabater Jara.

Título del trabajo: Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*

Nombre del congreso: Biotec 2017

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 18/06/2017

Fecha de finalización: 21/06/2017

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Begoña Miras Moreno; Polina Soluyanova; Victoriano Garre; María Ángeles Pedreño García; Lorena Almagro Romero.

Publicaciones durante el desarrollo de la tesis

Título del trabajo: Biofactorías celulares para la producción de metabolitos secundarios

Nombre del congreso: XII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia invitada/ Keynote

Ciudad de celebración: Madrid, Comunidad de Madrid, España

Fecha de celebración: 13/09/2017

Fecha de finalización: 15/09/2017

Autores (p. o. de firma): María Ángeles Pedreño García; Begoña Miras Moreno; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Laura Di Patria; Ana Belén Sabater Jara; Lorena Almagro Romero.

Título del trabajo: Broccoli cell cultures as biofactories to enhance the production of glucosinolates

Nombre del congreso: 4th International Glucosinolate Conference 2017

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Berlín, Alemania

Fecha de celebración: 17/09/2017

Fecha de finalización: 20/09/2017

Autores (p. o. de firma): María Ángeles Pedreño García; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Pilar Flores; Pilar Hellín; Lorena Almagro Romero.

Título del trabajo: Enhancement of triterpenoid compounds in *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited cell cultures

Nombre del congreso: 3rd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Bansko, Bulgaria

Fecha de celebración: 18/10/2017

Fecha de finalización: 21/10/2017

Autores (p. o. de firma): Ana Belén Sabater Jara; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Lorena Almagro; Begoña Miras Moreno; María Borja; Laura Di Patria; María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Elicitation of carrot cell cultures to increase a-tocopherol and phenolic compounds

Nombre del congreso: 3rd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Bansko, Bulgaria

Fecha de celebración: 18/10/2017

Fecha de finalización: 21/10/2017

Autores (p. o. de firma): Begoña Miras Moreno; Ana Belén Sabater Jara; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Sarai Belchí Navarro; Lorena Almagro; María Borja; María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Use of broccoli byproducts to obtain bioactive compounds

Nombre del congreso: 18th Biotechnology Congress

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Nueva York, EEUU

Fecha de celebración: 19/10/2017

Fecha de finalización: 20/10/2017

Autores (p. o. de firma): María Ángeles Pedreño; María Borja Martínez; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Lorena Almagro; Ana Belén Sabater Jara.

Título del trabajo: Effect of elicitors on the antioxidant activity of different plant cell cultures

Nombre del congreso: 18th Biotechnology Congress

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Nueva York, EEUU

Fecha de celebración: 19/10/2017

Fecha de finalización: 20/10/2017

Autores (p. o. de firma): Lorena Almagro; Carlos Cerón; Ana Belén Sabater Jara; Begoña Miras Moreno; Pedro Joaquín Sánchez Pujante; María Borja Martínez; María Isabel González Sánchez; Edelmira Valero Ruiz; María Ángeles Pedreño.

Publicaciones durante el desarrollo de la tesis

Título del trabajo: Effect of coronatine on glucosinolate production and the gene expression involved in their biosynthesis pathway in *Brassica oleracea* var. *Italica* cell cultures

Nombre del congreso: XIII Simposio Internacional De Biotecnología Vegetal

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Cayo Santa María, Cuba

Fecha de celebración: 08/05/2018

Fecha de finalización: 11/05/2018

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez-Pujante, Jorge Cerón-Hernández, Ana Belén Sabater-Jara, Sarai Belchí-Navarro, María Borja, María Ángeles Pedreño, Lorena Almagro.

Título del trabajo: Characterization of glucosinolate production from *Brassica oleracea* var. *Italica*

Nombre del congreso: XIII Simposio Internacional De Biotecnología Vegetal

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Cayo Santa María, Cuba

Fecha de celebración: 08/05/2018

Fecha de finalización: 11/05/2018

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez-Pujante, Jorge Cerón-Hernández, Matteo Gionfriddo, Pilar Hellín, Lorena Almagro, María Angeles Pedreño.

Título del trabajo: Producción de compuestos bioactivos y análisis de la expresión génica en cultivos celulares de brócoli

Nombre del congreso: IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 29/05/2018

Fecha de finalización: 31/05/2018

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante; Jorge Cerón Hernández, Sarai Belchí Navarro, Ana Belén Sabater Jara, María Borja Martínez, María Isabel Navarro Mendoza, Pilar Hellín, Pilar Flores, Lorena Almagro, María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Characterization of bioactive compounds in broccoli industry byproducts

Nombre del congreso: 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Alimentos y Bebidas

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 17/06/2018

Fecha de finalización: 20/06/2018

Autores (p. o. de firma): María Borja Martínez, Pedro Joaquín Sánchez Pujante, María Ángeles Pedreño, Ana Belén Sabater Jara.

Título del trabajo: Análisis de la producción de compuestos bioactivos en cultivos celulares de brócoli

Nombre del congreso: I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Almería, España

Fecha de celebración: 20/12/2018

Fecha de finalización: 20/12/2018

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Matteo Gionfriddo, Sarai Belchí Navarro, Ana Belén Sabater Jara, María Borja Martínez, Lorena Almagro Romero, Pedro Díaz Vivancos, M^a Ángeles Pedreño García.

Título del trabajo: Extracción mediante fluidos supercríticos de compuestos bioactivos a partir de subproductos del brócoli

Nombre del congreso: I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Almería, España

Fecha de celebración: 20/12/2018

Fecha de finalización: 20/12/2018

Autores (p. o. de firma): María Borja Martínez, Pedro Joaquín Sánchez Pujante, M^a Ángeles Pedreño García, Ana Belén Sabater Jara.

Publicaciones durante el desarrollo de la tesis

Título del trabajo: Estrategias biotecnológicas para aumentar la producción de compuestos naturales mediante el uso de cultivos de plantas *in vitro*.

Nombre del congreso: 12mo Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal y Agricultura.

Ámbito geográfico: Internacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia invitada/ Keynote

Ciudad de celebración: Ciego de Ávila, Cuba

Fecha de celebración: 27/05/2019

Fecha de finalización: 31/05/2019

Autores (p. o. de firma): María Ángeles Pedreño, Alicia De Gea, Isabel Nicolás Sánchez, Pedro Joaquín Sánchez-Pujante, Sarai Belchí Navarro, Lorena Almagro, Ana Belén Sabater Jara.

Título del trabajo: Producción de compuestos bioactivos y análisis del estrés oxidativo en cultivos celulares de brócoli elicitados

Nombre del congreso: V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

Ciudad de celebración: Murcia, Región de Murcia, España

Fecha de celebración: 29/05/2019

Fecha de finalización: 31/05/2019

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Matteo Gionfriddo, Cecilia Pugliese, Sarai Belchí Navarro, Ana Belén Sabater Jara, María Borja Martínez, Lorena Almagro, Pedro Díaz Vivancos, María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Eventos de señalización temprana en suspensiones celulares de brócoli elicitadas con coronatina

Nombre del congreso: XIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Vitoria-Gasteiz, País Vasco, España

Fecha de celebración: 11/09/2019

Fecha de finalización: 13/09/2019

Autores (p. o. de firma): Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Karla Daniela Pavón Ramón,

Sarai Belchí Navarro, Lorena Almagro, Ana Belén Sabater Jara, María Borja Martínez, María Ángeles Pedreño.

Título del trabajo: Estrategia biotecnológica para incrementar la producción de oxi-resveratrol mediante cultivo *in vitro* de morera

Nombre del congreso: XIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales

Ámbito geográfico: Nacional

Tipo de participación: Participativo - Póster

Ciudad de celebración: Vitoria-Gasteiz, País Vasco, España

Fecha de celebración: 11/09/2019

Fecha de finalización: 13/09/2019

Autores (p. o. de firma): Isabel Nicolás Sánchez, Laura Di Patria, Pedro Joaquín Sánchez Pujante, María Ángeles Pedreño, Ana Belén Sabater Jara.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
1. Metabolismo secundario de las plantas	7
1.1. Metabolismo secundario en la defensa vegetal.....	8
1.2. Aplicaciones de los metabolitos secundarios.....	10
2. Metabolismo antioxidante y proteínas de defensa de las plantas.....	10
2.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	11
2.2. Antioxidantes	15
2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos.....	16
2.2.2. Antioxidantes enzimáticos y el ciclo ascorbato-glutatión.....	18
2.3. Proteínas relacionadas con la defensa vegetal	21
3. Brócoli.....	22
3.1. Taxonomía y clasificación del brócoli.....	22
3.2. Origen y cultivo del brócoli	24
3.3. Composición nutricional del brócoli.....	27
4. Compuestos bioactivos en brócoli.....	29
4.1. Glucosinolatos	29
4.1.1. Biosíntesis y distribución de los glucosinolatos en plantas.....	30
4.1.1. Funciones de los glucosinolatos en plantas	31
4.1.2. Papel fisiológico de los glucosinolatos en humanos	32
4.2. Compuestos fenólicos	37
4.2.1. Biosíntesis y metabolismo de los compuestos fenólicos.....	39
4.2.2. Funciones de los compuestos fenólicos en plantas.....	41
4.2.3. Papel fisiológico de los compuestos fenólicos en humanos	44
5. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	47
5.1. Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> en brócoli.....	49
5.2. Suspensiones celulares vegetales como biofactorías para la producción de compuestos bioactivos	50
5.2.1. Elicitación de suspensiones celulares con ciclodextrinas.....	54
5.2.2. Elicitación de suspensiones celulares con jasmonato de metilo.....	55
5.2.3. Elicitación de suspensiones celulares con coronatina	57
5.2.1. Elicitación de suspensiones celulares con cloruro sódico	59

OBJETIVOS	60
PUBLICACIONES.....	61
1. Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant <i>in vitro</i> cultures	63
2. Increased glucosinolate production in <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> cell cultures due to coronatine activated genes involved in glucosinolate biosynthesis.....	64
3. Enhanced bioactive compound production in broccoli cells due to coronatine and methyl jasmonate is linked to antioxidative metabolism.....	65
ANEXO: RESULTADOS NO PUBLICADOS	67
1. Estudio del efecto de la adición de precursores biosintéticos sobre la producción de glucosinolatos	67
1.1. Efecto de la adición de hidrolizado de caseína sobre la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas	67
1.2. Efecto de la adición de triptófano sobre la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas	70
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

13-HPOT: ácido 13-hidroxi-peroxilinolénico

AA: ácido araquidónico

AKT: proteína kinasa B

AOC: aleno óxido ciclasa

AOS: aleno óxido sintasa

APX: ascorbato peroxidasa

ARE: elemento de respuesta antioxidante

CAT: catalasa

CD: ciclodextrina

CI: complejo I de la cadena de transporte electrónico

CIII: complejo III de la cadena de transporte electrónico

Cit_b: citocromo b

Cit_{p450}: citocromo P450

Clf: clorofila

Cor: coronatina

COX: ciclooxigenasa

CTE: cadena de transporte electrónico

DHA: dehidroascorbato

DHAR: dehidroascorbato reductasa

ERK: proteína kinasa regulada por señal extracelular

FLA1: fosfolipasa A1

FLA2: fosfolipasa A2

GOx: glicolato oxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

GST: glutatión S-transferasa

HC: hidrolizado de caseína

HO-1: hemo-oxigenasa 1

IL: interleucina
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
JMT: ácido jasmónico carboxil metiltransferasa
JNK: kinasa c-Jun N-terminal
LDL: lipoproteína de baja densidad
LOX: lipoxigenasa
MAPK: proteína kinasas activadas por mitógenos
MDHA: monodehidroascorbato
MDHAR: monodehidroascorbato reductasa
MMP: metaloproteinasas de matriz extracelular
NAD(P)⁺: nicotina adenina dinucleótido (fosfato) oxidado
NAD(P)H: nicotina adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NQO1: quinona óxidoreductasa 1
Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
O₂: oxígeno molecular
OPC: ácido 3-oxo-2(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico
OPDA: ácido 12-oxo-fitodienoico
PAL: fenilalanina amonio liasa
PI3K: fosfoinositol 3-kinasa
PKC: proteína kinasa C
POX: peroxidasa
PPO: polifenol oxidasa
Proteínas PR: proteínas relacionadas con la patogénesis
PS: peso seco
PSI: fotosistema I
PSII: fotosistema II
PTK: tirosina kinasa

Abreviaturas

ROS: especies reactivas de oxígeno

Rubisco: ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa

SFN: sulforafano

SOD: superóxido dismutasa

T_a: tiempo de agotamiento de nutrientes

TNF- α : factor de necrosis tumoral

Trp: Triptófano

UVB: ultravioleta B

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

V_{exp}: velocidad de crecimiento exponencial

XO: xantina oxidasa

RESUMEN

El consumo de brócoli se ha visto incrementado en todo el mundo debido a su alto valor nutritivo. Además, el brócoli contiene una compleja mezcla de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, entre los que destacan los glucosinolatos y sus derivados, así como los compuestos fenólicos. Debido a los beneficios para la salud que presentan estos metabolitos secundarios, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue la utilización de suspensiones celulares de brócoli para incrementar la producción de estos compuestos de interés.

En primer lugar, se realizó una revisión sobre la biosíntesis, la regulación y las funciones biológicas de los glucosinolatos en las plantas. Además, se profundizó en las diferentes estrategias biotecnológicas para su obtención, principalmente las basadas en las técnicas de cultivo de plantas *in vitro*. Posteriormente, se utilizó la elicitación como estrategia para incrementar la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli y se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de los glucosinolatos en estas suspensiones celulares de brócoli bajo condiciones de elicitación. También se realizaron experimentos de elicitación modificando diferentes condiciones de cultivo, con el fin de determinar cuáles fueron las condiciones óptimas para incrementar la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli.

Otro de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación fue analizar el efecto de los elicitores sobre el metabolismo antioxidante de las células de brócoli. Para ello, se realizaron medidas de la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo antioxidante, así como el contenido en glutatión y los niveles de peroxidación de lípidos en las suspensiones celulares de brócoli sometidas a elicitación. Finalmente, se estudió el patrón de bandas de proteínas expresadas diferencialmente bajo condiciones de elicitación en células de brócoli mediante SDS-PAGE, con el fin de identificar proteínas relacionadas con la defensa vegetal.

La principal conclusión obtenida de este trabajo de investigación fue que la elicitación de suspensiones celulares de brócoli con coronatina incrementó en gran medida la producción de glucosinolatos, constituyendo esta estrategia un sistema biotecnológico de producción de estos compuestos alternativo a la extracción tradicional de compuestos bioactivos a partir de materia prima vegetal. Además, la cantidad de

sacarosa, junto con la composición nutricional del medio de cultivo, la densidad celular utilizada y la adición de triptófano como precursor de la ruta de biosíntesis, fueron factores clave que limitaron la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli. Entre los efectos desencadenados por la coronatina sobre las suspensiones celulares de brócoli destacó el incremento en los niveles de expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis y la regulación de los glucosinolatos. En relación a los compuestos fenólicos, tanto la coronatina como el jasmonato de metilo fueron efectivos, ya que incrementaron la producción de estos compuestos bioactivos en las suspensiones celulares de brócoli.

El incremento en la producción de compuestos bioactivos conseguido por el tratamiento con elicitores se correlacionó con alteraciones en las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo antioxidante y en el estado redox del glutatión. Estos resultados, combinados con el incremento observado en la peroxidación de lípidos, sugirieron que la elicitación con coronatina y jasmonato de metilo condujo al establecimiento de un estrés oxidativo moderado en las suspensiones celulares de brócoli. Además, el estrés oxidativo indujo la síntesis de una serie de polipéptidos relacionados con la defensa vegetal en las suspensiones celulares de brócoli.

INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo secundario de las plantas

Durante la evolución, las plantas han desarrollado la habilidad de producir una gran cantidad de compuestos gracias a la existencia de una extensa red de rutas metabólicas (Pichersky y Gang, 2000) que se engloban, bien dentro del “metabolismo primario” o bien, pertenecen al “metabolismo secundario”. El metabolismo primario comprende una serie de procesos anabólicos y catabólicos que son necesarios durante la respiración, la asimilación de nutrientes y el crecimiento. Por otro lado, el metabolismo secundario hace referencia a aquellos procesos que se realizan en células especializadas, las cuales producen compuestos que no parecen tener una función directa con los procesos relacionados con el crecimiento, pero son requeridos para la supervivencia de las plantas en el medio que habitan (Kliebenstein, 2004), siendo de vital importancia en la interacción de las plantas con el ambiente, las estrategias reproductivas o los mecanismos de defensa (Cheynier et al., 2013).

En este sentido, como organismos sésiles, las plantas no son capaces de escapar del ataque de herbívoros o de las infecciones provocadas por microorganismos patógenos, como los hongos y las bacterias. Por ello, la planta pone en marcha otro tipo de respuestas para repeler o producir efectos tóxicos sobre los herbívoros o para inhibir el crecimiento y desarrollo de hongos, bacterias o incluso virus. Además, los metabolitos secundarios pueden ejercer funciones fisiológicas y ecológicas adicionales a la defensa, como es el caso de los compuestos que sirven como reservorios de nitrógeno, los atrayentes de animales polinizadores o los compuestos que actúan de intermediarios en las interacciones entre las bacterias simbióticas y las plantas hospedadoras (Wink, 2008).

La biosíntesis de determinados metabolitos secundarios está restringida a ciertos grupos de plantas, siendo esta habilidad adquirida durante el transcurso de la evolución, dependiendo de las necesidades específicas de cada linaje de plantas (Pichersky y Gang, 2000). Por ejemplo, se piensa que la biosíntesis de los glucosinolatos apareció en las plantas hace aproximadamente 85-90 millones de años, debido a mutaciones ocurridas en los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los glucósidos cianogénicos (muy distribuidos en el reino vegetal). En la actualidad, esta capacidad de producir

glucosinolatos está restringida al orden Brassicales y a determinados géneros de la familia Putranjivaceae (Stauber et al., 2012).

Según su naturaleza, los metabolitos secundarios se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

- **Terpenoides.** Este amplio grupo de metabolitos está compuesto por estructuras derivadas del isopreno y presentan diversas funciones en las plantas, actuando como pigmentos (carotenoides), como componentes estructurales de las membranas celulares (fitoesteroles) o como hormonas (giberelinas y ácido abscísico).
- **Compuestos fenólicos.** Metabolitos con anillos aromáticos cuya estructura puede variar desde los ácidos hidroxibenzoicos y fenilpropanoicos sencillos como el ácido benzoico o el *p*-cumárico, hasta grandes polímeros de peso molecular elevado como los taninos condensados o las ligninas.
- **Compuestos nitrogenados.** Entre los compuestos nitrogenados destacan los alcaloides (principalmente los derivados de aminoácidos) por su amplia distribución y sus funciones defensivas en plantas, así como los glucósidos cianogénicos.
- **Compuestos azufrados.** En general, estos compuestos presentan una función defensiva en las plantas, destacando especialmente los glucosinolatos en el orden Brassicales y la aliina en el género *Allium* L. (Ahmed et al., 2017).

1.1. Metabolismo secundario en la defensa vegetal

En general, la exposición de las plantas a estreses de diferente naturaleza inicia una cascada de reacciones que conducen a la biosíntesis de metabolitos secundarios con propiedades defensivas (Pedras y Adio, 2008). Por ejemplo, cuando se produce el ataque de un patógeno, la planta pone en marcha la biosíntesis de las llamadas “fitoalexinas”, que presentan actividad antimicrobiana. Estas fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados en las células vegetales como resultado de la interacción con un patógeno, requiriendo la inducción de la expresión de los genes implicados en su ruta biosintética (Lattanzio et al., 2006). Por el contrario, existen

metabolitos secundarios de defensa que se encuentran en la planta de manera constitutiva, aunque su biosíntesis se puede incrementar en respuesta a diferentes condiciones de estrés, siendo estos compuestos referidos como “fitoanticipinas” (Pedras et al., 2009).

Un gran número de compuestos fenólicos se acumulan en los tejidos vegetales, actuando como fitoalexinas y fitoanticipinas (Bhattacharya et al., 2010). Muchos de estos compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana se almacenan en las células en forma de conjugados, permaneciendo inactivos. Sin embargo, cuando se produce el ataque de un patógeno, estos compuestos son rápidamente activados mediante la actuación de enzimas como las glucosidasas, liberándose sus formas agliconas (Lattanzio et al., 2006). Un ejemplo de fitoanticipinas es el caso de los glucosinolatos, que se encuentran almacenados en las células hasta que un daño tisular pone en contacto estos compuestos con la enzima mirosinasa, liberándose los compuestos con actividad biológica (War et al., 2012).

Por otro lado, el metabolismo secundario no solo es esencial en la defensa de las plantas frente a determinados patógenos, herbívoros o factores ambientales, sino que también existe la necesidad de desarrollar respuestas de defensa contra otras plantas. En la naturaleza, las plantas compiten constantemente con otras plantas por recursos como la luz, el agua o los nutrientes. A menudo, los metabolitos secundarios sirven como mediadores en las interacciones entre plantas, teniendo lugar un fenómeno llamado “alelopatía” (Wink, 2008). La alelopatía implica efectos directos o indirectos, así como adversos o beneficiosos, de una planta sobre otra, mediante la liberación de compuestos “aleloquímicos” al medio ambiente (Li et al., 2010; Samanta et al., 2011). Entre los mecanismos de acción de los compuestos aleloquímicos destacan: el aumento en la permeabilidad de las membranas, la inhibición de ciertos procesos como la germinación, la absorción de los nutrientes, la biosíntesis de hormonas, la elongación radicular o el desarrollo de la planta completa, la alteración de la fotosíntesis o la respiración, así como la inhibición de la actividad de ciertas enzimas (Li et al., 2010).

Durante todo su ciclo vital, las plantas están sujetas a una gran cantidad de factores ambientales e intrínsecos a su metabolismo, los cuales pueden causar situaciones que conducen, por ejemplo, a la generación de una serie de radicales libres capaces de dañar los componentes celulares. Además de las funciones defensivas que presentan los metabolitos secundarios, los cuales son capaces de neutralizar estos radicales, las plantas

han desarrollado un complejo sistema antioxidante como defensa frente al daño oxidativo (Bartwal et al., 2013).

1.2. Aplicaciones de los metabolitos secundarios

Debido a sus diversas propiedades biológicas y físico-químicas, los metabolitos secundarios han despertado un gran interés comercial, siendo ampliamente utilizados como ceras, aceites, perfumes, cosméticos, drogas, colorantes y aditivos alimentarios, entre otros usos (Ahmed et al., 2017; Theis y Lerda, 2003). Cabe destacar también el papel beneficioso que pueden desempeñar los metabolitos secundarios de las plantas en la salud humana, actuando como compuestos bioactivos en el organismo (Jeandet, 2015). Estas propiedades beneficiosas sobre la salud que presentan los metabolitos secundarios son las principales responsables del término “superalimento”, que se le ha otorgado a ciertas frutas y verduras (Van Den Driessche et al., 2018). Además, se han llevado a cabo diferentes estrategias para aumentar la concentración de estos compuestos en determinados alimentos, dando lugar a lo que se conoce como “alimento funcional”. Los alimentos funcionales, gracias al incremento en sus compuestos bioactivos, proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (Moreno et al., 2006). También se ha acuñado el término de “nutracéuticos” para aquellos suplementos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de determinadas enfermedades (Kalra, 2003). Por todo ello, en los últimos años se ha incrementado la demanda del uso de suplementos dietéticos, alimentos funcionales y nutracéuticos en la industria alimentaria (Liu, 2003).

2. Metabolismo antioxidante y proteínas de defensa de las plantas

Las plantas se encuentran sujetas de forma irremediable a diferentes estreses, tanto bióticos como abióticos. Dentro del estrés biótico se incluyen las infecciones por patógenos (hongos, bacterias y virus), así como la acción de determinados herbívoros. Por otro lado, el estrés abiótico hace referencia a factores ambientales como las temperaturas extremas, la salinidad, la sequía, la alta radiación lumínica, la falta de nutrientes o la acumulación de metales pesados o pesticidas. Estos factores pueden llegar a afectar enormemente a la agricultura, provocando una disminución de la productividad en cultivos de gran importancia económica. En general, esta pérdida de la producción agraria está causada por un incremento del estrés oxidativo en las plantas, y va a ser

dependiente de sus capacidades adaptativas (Caverzan et al., 2016). En este sentido, las plantas han desarrollado complejos mecanismos de defensa basados en las rutas de señalización, los cuales pueden desembocar en la activación del metabolismo antioxidante y/o la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa vegetal (Kim et al., 2011; Sewelam et al., 2016; Sharma et al., 2012).

2.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

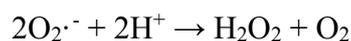
Una consecuencia inevitable del metabolismo aerobio es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la reducción del oxígeno molecular (O_2) debido a una exposición a energía alta o a reacciones de transferencia electrónica. Las actividades de transporte electrónico llevadas a cabo en los cloroplastos, las mitocondrias o las membranas celulares de las plantas son las responsables de la inevitable reducción del O_2 que conduce a la formación de ROS (Gupta y Igamberdiev, 2016). Además, ciertas rutas metabólicas como la fotorrespiración o la β -oxidación de los ácidos grasos producida en los peroxisomas también pueden ser las desencadenantes de la producción de ROS (Gill y Tuteja, 2010).

Cuando los niveles de ROS se incrementan, las células entran en un estado de “estrés oxidativo”, donde se producen fenómenos como la peroxidación de lípidos de membrana, la oxidación de proteínas, el daño de los ácidos nucleicos, la inhibición enzimática o incluso la activación de la muerte celular programada. Por todo ello, durante años se ha considerado que la producción de ROS supone una condición de patogénesis en la fisiología de las plantas (Kolupaev et al., 2019; Sharma et al., 2012). Sin embargo, se ha observado que, a concentraciones bajas, las ROS actúan como moléculas señal que conducen a la inducción de respuestas de defensa en las plantas frente a condiciones de estrés (Hasanuzzaman et al., 2012). Para ello, las plantas presentan una serie de mecanismos que requieren de la existencia de proteínas sensibles a los cambios del estado redox, siendo directa o indirectamente oxidadas por los radicales, y que son capaces de iniciar las rutas de transducción de la señal que conducen a las respuestas defensivas de las plantas (Das et al., 2015). Entre las formas más comunes de ROS, cabe destacar las siguientes:

- Oxígeno singlete (1O_2). Se trata del primer estado de excitación del O_2 , que ocurre mediante la elevación de un electrón a un orbital de mayor

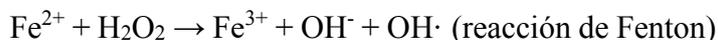
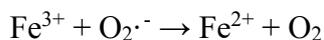
energía. Este radical libre es inusual desde el punto de vista de su formación, ya que no requiere una transferencia electrónica, sino una transferencia energética. La insuficiencia en la disipación de energía durante la fotosíntesis puede conducir a la formación de la clorofila en estado triplete, la cual puede reaccionar con el O₂ para producir el ¹O₂ (Gill y Tuteja, 2010). El ¹O₂ es capaz de reaccionar con diferentes moléculas, oxidando proteínas y ácidos grasos poliinsaturados de las membranas o modificando el ADN mediante la reacción selectiva con la guanina (Ahmad et al., 2010).

- Anión superóxido (O₂^{·-}). Se forma a partir del O₂ debido a la transferencia de un solo electrón. Esta reducción del O₂ ocurre en las cadenas de transporte electrónico que tienen lugar en compartimentos celulares como las mitocondrias y los cloroplastos. En los tejidos de las plantas, entre un 1 y un 2 % del oxígeno consumido conduce a la generación de O₂^{·-}. Este radical presenta una reactividad moderada, pero puede dar lugar a la formación de otros radicales más reactivos. (Gill y Tuteja, 2010).
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El H₂O₂ se forma a partir del O₂^{·-} mediante la aceptación de un electrón y dos protones, tanto de forma no enzimática como mediante la acción de la superóxido dismutasa (SOD):



El H₂O₂ es moderadamente reactivo, presentando una mayor estabilidad en comparación con otros radicales y no presenta electrones desapareados. Además, es capaz de atravesar las membranas biológicas, causando efectos oxidativos en compartimentos celulares distintos al lugar donde se ha formado. A altas concentraciones, el H₂O₂ puede oxidar los residuos de cisteína o metionina, así como inactivar enzimas mediante la oxidación de sus grupos tiol. Sin embargo, debido a su alta difusión por las células, el H₂O₂ ha recibido una especial atención como molécula señal, actuando a bajas concentraciones como inductor de las respuestas de defensa de las plantas (Sharma et al., 2012).

- Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). La formación de este radical se produce a partir del H_2O_2 y del $\text{O}_2\cdot^-$, mediante un proceso de catálisis metálica en dos pasos conocido como la reacción de Haber-Weiss:



El $\text{OH}\cdot$ presenta un electrón desapareado y es el radical más reactivo, interactuando con cualquier molécula biológica y causando daños celulares como la oxidación de proteínas y del ADN, la peroxidación lipídica o la destrucción de membranas celulares. Debido a que no existe un mecanismo enzimático que elimine el $\text{OH}\cdot$, el exceso en su producción puede conducir irremediablemente a la muerte celular (Gill y Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012).

Como puede observarse en la Figura 1, la producción de ROS tiene lugar en diferentes compartimentos celulares. Los cloroplastos son orgánulos que conllevan una gran producción de ROS en las células vegetales (Hasanuzzaman et al., 2012). La formación del $^1\text{O}_2$ a partir de la clorofila en estado triplete tiene lugar en los complejos antena y en el centro de reacción del fotosistema II (Sharma et al., 2012). Por otro lado, la sobrecarga de las cadenas de transporte electrónico de ambos fotosistemas (I y II) produce que el flujo de electrones pase desde proteínas como la ferredoxina hasta la reducción del O_2 para formar $\text{O}_2\cdot^-$, mediante la llamada reacción de Mehler. El $\text{O}_2\cdot^-$ es transformado después en H_2O_2 mediante la acción de Cu/Zn-SOD de las membranas de los cloroplastos (Das y Roychoudhury, 2014) y, finalmente, la presencia de iones metálicos en los cloroplastos induce las condiciones adecuadas para que se produzca la reacción de Fenton y se forme el $\text{OH}\cdot$ (Dietz et al., 2016). Además, diversos estreses como la salinidad o la sequía provocan el cierre estomático y desembocan en baja disponibilidad de CO_2 , lo cual favorece la formación de $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2\cdot^-$, produciendo efectos dañinos sobre los fotosistemas o sobre la maquinaria fotosintética en general (Das y Roychoudhury, 2014).

Cabe destacar que, cuando la fijación de CO_2 se ve alterada en los cloroplastos, la actividad oxigenasa de la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) se incrementa y el glicolato producido se transporta hacia los peroxisomas, donde ocurre parte de la fotorrespiración (Hasanuzzaman et al., 2012). Posteriormente, en los

peroxisomas se forma H_2O_2 mediante la acción de la glicolato oxidasa, que transforma el glicolato en glioxilato. El H_2O_2 también puede ser producido en los peroxisomas durante la β -oxidación de los ácidos grasos. Por otro lado, el $O_2^{\cdot-}$ también puede ser generado en los peroxisomas, produciéndose mediante varios mecanismos: la acción de la xantina oxidasa en la matriz de los peroxisomas y la oxidación de NAD(P)H en la membrana de estos orgánulos (Kolupaev et al., 2019).

Aunque la producción de ROS en las mitocondrias es menor que en los cloroplastos, se piensa que esta producción de radicales actúa como un importante regulador de una serie de procesos celulares, incluyendo la adaptación a estrés o la muerte celular programada (Hasanuzzaman et al., 2012). La gran cantidad de transportadores electrónicos que se ubican en las mitocondrias conduce a la inevitable reducción del O_2 en $O_2^{\cdot-}$, especialmente a partir de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico (Gupta y Igamberdiev, 2016).

Otras fuentes importantes en la producción de ROS en las células vegetales son las reacciones de detoxificación catalizadas por las enzimas citocromo P450 en el citoplasma y en el retículo endoplásmico (Gill y Tuteja, 2010). En el retículo endoplásmico, el transporte electrónico dependiente de NAD(P)H y mediado por las enzimas citocromo P450 genera $O_2^{\cdot-}$ (Sharma et al., 2012). Además, la generación de ROS a nivel de la membrana plasmática y en el apoplasto, parece tener una relación directa con la defensa de las plantas frente a infecciones por patógenos (Das y Roychoudhury, 2014). En este sentido, la NADPH oxidasa de las membranas celulares es capaz de utilizar el NADPH citoplasmático para producir $O_2^{\cdot-}$ en el apoplasto (Kolupaev et al., 2019). Otras enzimas implicadas en la producción de ROS a nivel extracelular son las oxidasas y las peroxidasas de pared celular, las cuales generan H_2O_2 que liberan al apoplasto (Caverzan et al., 2016).

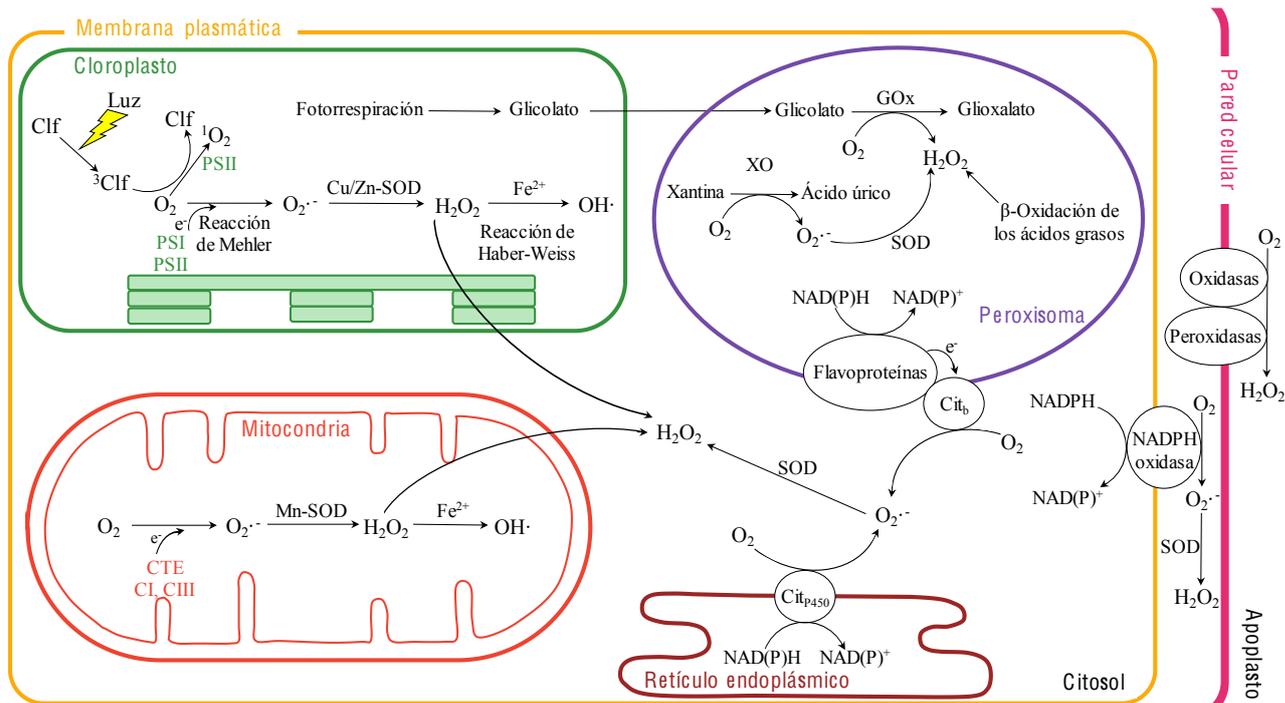


Figura 1. Esquema de la producción de ROS en diferentes compartimentos de las células vegetales. CI, complejo I de la cadena de transporte electrónico; CIII, complejo III de la cadena de transporte electrónico; Cit_b , citocromo b; Cit_{p450} , citocromo P450; Clf, clorofila; CTE, cadena de transporte electrónico; GOx, glicolato oxidasa; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II; SOD, superóxido dismutasa; XO, xantina oxidasa. (Caverzan et al., 2016; Das y Roychoudhury, 2014; Dietz et al., 2016; Gupta y Igamberdiev, 2016; Hasanuzzaman et al., 2012; Kolupaev et al., 2019; Sharma et al., 2012).

2.2. Antioxidantes

El balance entre la producción y la eliminación de ROS a nivel celular debe ser estrechamente regulado, con el fin de evitar el daño celular causado por los radicales y garantizar el mantenimiento del metabolismo y el desarrollo de la planta. Sin embargo, cuando se genera una sobreproducción de ROS que no llega a ser neutralizada, como ocurre en ciertas situaciones de estrés, la homeostasis redox se descompensa y se produce una situación de estrés oxidativo (Caverzan et al., 2016). Para combatir esta situación, las plantas presentan una serie de sistemas antioxidantes, los cuales incluyen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Sewelam et al., 2016).

2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes de bajo peso molecular se comportan como amortiguadores de las reacciones redox y pueden actuar como cofactores enzimáticos, jugando un papel clave en la defensa, la proliferación celular o el envejecimiento en las plantas (Das et al., 2015). Estos antioxidantes pueden ser agrupados en dos clases generales: los antioxidantes liposolubles asociados a membranas (como el α -tocoferol y el β -caroteno) y los antioxidantes hidrosolubles (como el glutatión y el ácido ascórbico) (Jaleel et al., 2009).

- **Ácido ascórbico.** El ácido ascórbico (vitamina C) es el antioxidante más abundante y ampliamente estudiado en las plantas. Se trata de un potente donador de electrones que interviene en un extenso rango de reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Das y Roychoudhury, 2014). En las células vegetales, el ácido ascórbico es el sustrato reductor más potente para la eliminación del H_2O_2 (Jaleel et al., 2009), siendo eficaz también en la neutralización de otros radicales como el $\text{O}_2^{\cdot -}$ y el OH^{\cdot} . Además, el ácido ascórbico participa en la regeneración de otros antioxidantes, como el α -tocoferol, así como en la reducción de las xantofilas, como la violaxantina. Por todo ello, el ácido ascórbico también ejerce un efecto protector de las membranas biológicas y actúa en la disipación del exceso de energía. Gran parte del ácido ascórbico se localiza en el citoplasma, sin embargo, también se encuentra en el apoplasto, donde se cree que podría constituir la primera línea de defensa frente a agentes oxidantes externos (Das y Roychoudhury, 2014).
- **Glutatión.** Se trata de un tripéptido (α -Glu-Cys-Gly) que se localiza en prácticamente todos los compartimentos celulares y constituye la mayor fuente de grupos tiol no proteicos en las células vegetales. La reactividad química del grupo tiol del glutatión, junto con su relativa estabilidad y solubilidad en agua hacen que este tripéptido sea particularmente adecuado para cumplir una serie de funciones bioquímicas (Shao et al., 2008). Entre estas funciones destacan el control de los niveles de ROS para evitar el daño sobre diferentes biomoléculas, así como la regeneración del ácido ascórbico mediante el ciclo ascorbato-glutatión (Das y Roychoudhury, 2014) o la detoxificación de xenobióticos. Se ha sugerido

que la relación entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), indicativa del estado redox, puede estar implicada en la percepción de ROS por parte de las células (Shao et al., 2008). En este sentido, se sabe que los cambios en la relación GSH/GSSG debido a la neutralización del H₂O₂, actúa directa o indirectamente sobre la regulación transcripcional y postraduccional de proteínas implicadas en el metabolismo antioxidante (Szalai et al., 2009).

- **Tocoferoles.** Se trata de un tipo de antioxidantes que se sintetizan en todas las plantas. De entre los cuatro isómeros (α , β , γ y δ), el α -tocoferol (vitamina E) es el más activo biológicamente, predominando en las membranas de los cloroplastos donde actúa eficazmente neutralizando el ¹O₂. Otra de las funciones básicas de estos compuestos es la protección de los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienden a ser oxidados en los cloroplastos debido a la producción de ROS. Debido a su capacidad de neutralización de ROS, así como de los productos de la oxidación lipídica, los tocoferoles resultan esenciales en las plantas como estabilizadores de las membranas celulares, especialmente las del aparato fotosintético (Ahmad et al., 2010).
- **Carotenoides.** Estos compuestos, presentes en plantas y microorganismos, presentan una cadena de residuos de isopreno que contiene dobles enlaces, lo cual les permite recibir energía desde otras moléculas excitadas y la posterior disipación del exceso de energía en forma de calor (Sharma et al., 2012). Por tanto, los carotenoides, como el β -caroteno o la xantofila zeaxantina, poseen un importante papel en la fotoprotección del aparato fotosintético. Al igual que los tocoferoles, los carotenoides son capaces de secuestrar el ¹O₂, así como otros radicales, suprimiendo los efectos negativos de la peroxidación lipídica y protegiendo la maquinaria fotosintética (Gill y Tuteja, 2010).
- **Compuestos fenólicos.** Estos metabolitos secundarios son muy abundantes en los tejidos vegetales y su capacidad antioxidante se basa en su reactividad como donadores de hidrógeno y electrones, lo que les confiere la capacidad de neutralizar ROS. Además, los compuestos fenólicos son quelantes de iones metálicos, los cuales son necesarios para que tenga lugar la reacción de Fenton (Ahmad et al., 2010).

2.2.2. Antioxidantes enzimáticos y el ciclo ascorbato-glutati3n

Los antioxidantes enzimáticos se localizan en diferentes compartimentos celulares y juegan un papel muy importante en la neutralizaci3n de ROS en las c3lulas vegetales, al igual que los antioxidantes no enzimáticos. Entre los principales antioxidantes enzimáticos, destacan la super3xido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxidasa (POX) y la glutati3n S-transferasa (GST). Adem3s, es importante destacar las enzimas implicadas en el ciclo ascorbato-glutati3n: la ascorbato peroxidasa (APX), la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), la dehidroascorbato reductasa (DHAR) y la glutati3n reductasa (GR) (Figura 2). En el ciclo ascorbato-glutati3n, estas enzimas conforman una serie de reacciones c3clicas que tienen como fin la neutralizaci3n de ROS y la posterior regeneraci3n de 3cido asc3rbico y GSH (Das et al., 2015; Hasanuzzaman et al., 2012).

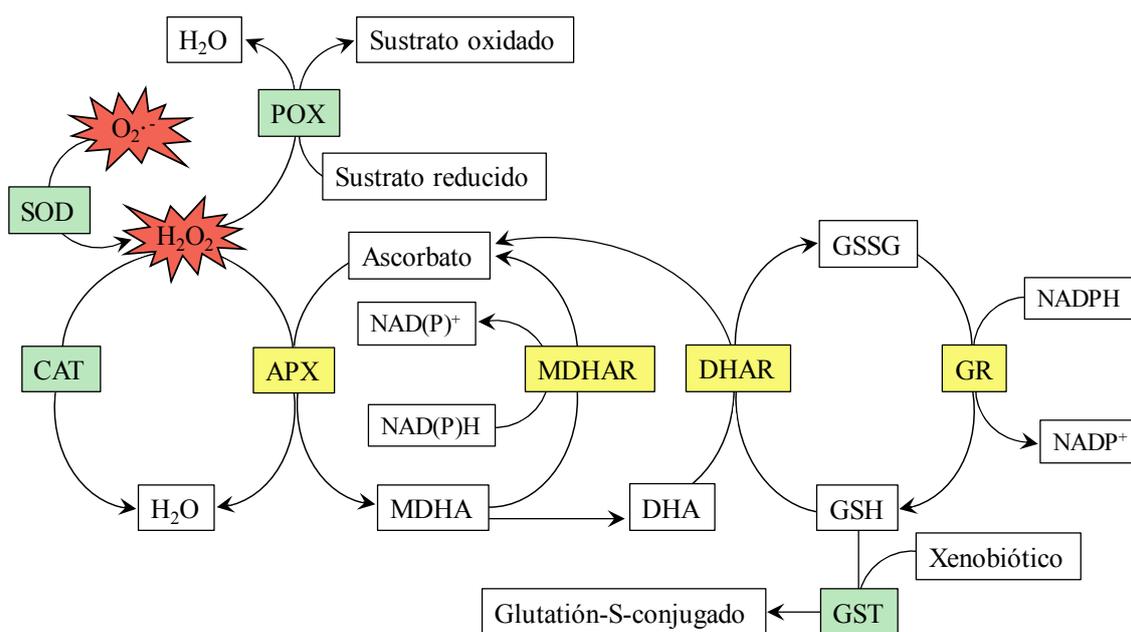


Figura 2. Mecanismos de neutralizaci3n de ROS mediante diferentes enzimas antioxidantes. Las enzimas del ciclo ascorbato-glutati3n se indican en color amarillo. APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GR, glutati3n reductasa; GSH, glutati3n reducida; GSSG, glutati3n oxidada; GST, glutati3n S-transferasa; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; $NAD(P)^+$, nicotina adenina dinucle3tido (fosfato) oxidado; $NAD(P)H$, nicotina adenina dinucle3tido (fosfato) reducido; POX, peroxidasa de clase III; SOD, super3xido dismutasa. (Hasanuzzaman et al., 2012; Hern3ndez et al., 2017; Hiraga et al., 2001).

La SOD es una enzima ampliamente distribuida entre todos los organismos aerobios. Se trata de una metaloproteína multimérica que puede contener diferentes cofactores metálicos, existiendo, por ejemplo, Cu/Zn-SOD (localizadas en el citosol y los cloroplastos), Mn-SOD (dentro de la matriz mitocondrial) o Fe-SOD (presente en los cloroplastos) (Mourato et al., 2015; Scandalios, 1993). Esta enzima cataliza la eliminación del $O_2^{\cdot -}$ mediante su dismutación hasta H_2O_2 y O_2 . Con ello se evita la posibilidad de la formación de OH^{\cdot} mediante la reacción de Haber-Weiss. En diversos estudios se ha observado un aumento en la expresión de SOD llevado a cabo por diferentes condiciones de estrés, sugiriendo un papel clave de esta enzima en mecanismos de adaptación (Das y Roychoudhury, 2014; Gill y Tuteja, 2010).

El H_2O_2 puede ser eliminado mediante la acción de la CAT, liberándose O_2 y H_2O . La CAT es una enzima tetramérica que contiene un grupo hemo y se localiza especialmente en los peroxisomas, donde neutraliza el H_2O_2 generado mediante el metabolismo en estos orgánulos. Aunque esta enzima también ha sido detectada en otros compartimentos celulares como el citosol, los cloroplastos o las mitocondrias, su actividad parece ser menor que en los peroxisomas (Sharma et al., 2012).

Entre las enzimas neutralizadoras de H_2O_2 también destacan las POX de clase III, las cuales son glicoproteínas que presentan un grupo hemo en su estructura. Estas enzimas se encuentran localizadas en las paredes y en las vacuolas de las células vegetales y catalizan la oxidorreducción entre el H_2O_2 y diferentes sustratos. Las POX presentan una serie de funciones esenciales a lo largo de todo el ciclo vital de las plantas, estando involucradas en procesos como la lignificación o el metabolismo de las auxinas (Hiraga et al., 2001).

En las plantas, las GST constituyen un extenso y diverso grupo de enzimas que catalizan la inactivación por conjugación de sustancias xenobióticas con el GSH (Dixon et al., 2010). Además, algunas GST son capaces de neutralizar peróxidos generados durante el estrés oxidativo utilizando el GSH (Dixon et al., 2002). Estas enzimas son muy abundantes, llegando incluso a representar más del 1 % de las proteínas solubles en las células vegetales. Entre las funciones de las GST no solo se encuentra la detoxificación de xenobióticos o radicales, también se han visto implicadas en el metabolismo secundario, la homeostasis hormonal o la regulación de la apoptosis en las respuestas defensivas de las plantas (Dixon et al., 2010; Gill y Tuteja, 2010).

En relación al ciclo ascorbato-glutatión en las plantas, se sabe que tiene lugar en el citosol, las mitocondrias, los plastidios y los peroxisomas. Como se puede observar en la Figura 2, la primera reacción del ciclo consiste en la reducción del H_2O_2 hasta agua mediante la enzima APX, la cual utiliza el ascorbato como donador de electrones específico, resultando en la formación de monodehidroascorbato (MDHA) (Pang y Bao-Shan, 2010). Esta enzima presenta una mayor afinidad por el H_2O_2 que la CAT y la POX pero, cuando la concentración de ascorbato es menor de 20 μM , la APX es inactivada rápidamente y pierde su estabilidad (Ahmad et al., 2010; Pang y Bao-Shan, 2010). También se ha sugerido que la APX es muy importante durante los primeros estados de la adaptación de las plantas frente a condiciones de estrés, pudiendo ser requerida para la estrecha modulación de las rutas de transducción de señal desencadenadas por ROS (Ahmad et al., 2010; Davletova et al., 2005).

El MDHA producido en este primer paso del ciclo ascorbato-glutatión puede ser espontáneamente transformado en dehidroascorbato (DHA) o bien ser directamente reducido a ascorbato de nuevo mediante la enzima MDHAR. El DHA también puede reducirse a ascorbato por la acción de la DHAR, a expensas de GSH (Chew et al., 2003). La enzima MDHAR utiliza el NAD(P)H como donador de electrones y, junto con la DHAR, juega un importante papel en el mantenimiento de las reservas de ascorbato en las células vegetales (Caverzan et al., 2016; Das y Roychoudhury, 2014). Aunque la reacción catalizada por la MDHAR es más rentable desde el punto de vista energético para las células vegetales, se ha observado que, bajo ciertas condiciones, la enzima DHAR puede resultar una buena estrategia para mantener el estado redox del ascorbato (Hernández et al., 2017).

La acción de la DHAR conduce a producción de GSSG, el cual necesita volver a ser reducido hasta GSH para cumplir sus funciones. La enzima encargada de reducir el GSSG a GSH es la GR, que es una flavoproteína que contiene un puente disulfuro esencial. La GR depende del poder reductor del NADPH para producir el GSH y mantener alta la relación GSH/GSSG en las células (Sharma et al., 2012). Mediante la acción de la GR también se acelera, de forma indirecta, la neutralización del H_2O_2 que tiene lugar en la primera reacción del ciclo ascorbato-glutatión. De esta manera, cabe destacar que tanto el ascorbato como el glutatión son reciclados y el flujo electrónico neto en el ciclo ocurre desde el NADPH hasta el H_2O_2 . Por todo ello, tanto la GR como la APX son las enzimas clave del ciclo ascorbato-glutatión; de hecho, la actividad de ambas enzimas se ha visto

incrementada en diferentes especies de plantas bajo condiciones de estrés (Pang y Bao-Shan, 2010).

2.3. Proteínas relacionadas con la defensa vegetal

Las plantas son capaces de responder a los factores ambientales mediante la inducción de mecanismos que incluyen la expresión de una serie de genes que están asociados con las respuestas defensivas. Algunos de estos genes están implicados directamente en la inducción de la síntesis de las llamadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Estas proteínas PR han sido muy estudiadas y se ha observado que no solo son inducidas en las plantas por la infección de los patógenos, sino también por el ataque de insectos y herbívoros o por la acción de otros estreses abióticos (Liu y Ekramoddoullah, 2006; Sudisha et al., 2012). La acumulación de proteínas PR no solo tiene lugar localmente en el tejido afectado, sino que también se ha asociado con la inducción de la respuesta hipersensible o la resistencia sistémica adquirida. Cabe destacar que, aunque la mayoría de proteínas PR son de naturaleza extracelular, algunas de ellas se encuentran en el interior celular, fundamentalmente en el citoplasma y en la vacuola (Jain y Kumar, 2015). La aparición de las proteínas PR es muy limitada en los eventos tempranos de señalización desencadenados por un estímulo, apareciendo en mayor medida como eventos tardíos de las respuestas de defensa de las plantas. Además, las proteínas PR pueden alcanzar altas concentraciones, llegando incluso a representar hasta el 10 % del contenido en proteína soluble total (Sudisha et al., 2012).

En base a propiedades funcionales y estructurales, las proteínas PR se han clasificado hasta en 17 familias diferentes (van Loon et al., 2006). Algunas de las proteínas PR más destacadas son las que tienen actividad β -1,3-glucanasa, tanto las vacuolares como de secreción (proteínas PR-2); las quitinasas con actividad hidrolítica sobre enlaces β ,1-4 en los residuos de N-acetilglucosamina de la quitina en las paredes celulares de los hongos (proteínas PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11) (Sudisha et al., 2012; Taiz y Zeiger, 2010); o las POX con un papel de refuerzo de la pared celular y la participación en la señalización mediada por ROS (proteínas PR-9) (Almagro et al., 2009; Hiraga et al., 2001).

Otras proteínas implicadas en la defensa vegetal son las lectinas o aglutininas, que son un grupo de proteínas muy heterogéneo que reconocen y se unen reversiblemente a

carbohidratos específicos. Estas lectinas presentan un papel clave en la defensa frente a insectos fitófagos, uniéndose a carbohidratos presentes en el sistema digestivo de estos insectos una vez que han ingerido la planta (Vandenborre et al., 2011; Xiang et al., 2011). También son importantes otras proteínas como las inhibidoras de proteasas (inhibidoras de serina proteasas, inhibidoras de cisteína proteasas o inhibidoras de aspartato/metalo proteasas), las cuales también son inducidas en respuesta al ataque por patógenos o herbívoros (proteínas PR-6). A su vez, las proteínas inhibidoras de serina proteasas se pueden subdividir en diferentes categorías, destacando las proteínas inhibidoras de tipo Kunitz (20-22 kDa), muy distribuidas en la mayoría de plantas (Sudisha et al., 2012).

3. Brócoli

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) es una planta herbácea anual que pertenece a la familia Brassicaceae (Aires, 2015). La palabra “brócoli” tiene un origen italiano y, a su vez, procede del latín “*brachium*”, que significa “brazo” o “rama” (Gray, 1982), refiriéndose a la ramificación que tiene lugar en sus tallos florales. Las inflorescencias en el brócoli se caracterizan por presentar un desarrollo hipertrofiado, constituyendo una pella que generalmente es de color verde debido a la presencia de clorofila (Branca, 2008).

3.1. Taxonomía y clasificación del brócoli

La familia Brassicaceae o familia de las crucíferas alberga 375 géneros y alrededor de 3.200 especies (Ishida et al., 2014). El nombre de esta familia hace referencia a sus características flores provistas de una corola de cuatro pétalos dispuestos en forma de cruz (Franzke et al., 2011). En esta familia se ubican especies de plantas ampliamente cultivadas con fines agrícolas, como las hortalizas pertenecientes al género *Brassica* L., así como la rúcula (*Eruca vesicaria* L. Cavan.), los rábanos (*Raphanus sativus* L.), los berros (*Lepidium sativum* L.) o la mostaza blanca (*Sinapis alba* L.). También pertenecen a esta familia géneros de plantas ornamentales como *Alyssum* L. y *Hesperis* L., además de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Couvreur et al., 2010; Koch et al., 2003).

Desde el punto de vista evolutivo, la familia de las crucíferas representa un sistema modelo fascinante debido a su amplia distribución geográfica, especialmente por regiones

templadas y con escasa aparición en regiones subtropicales. Además, resulta muy interesante su alta tasa de diversificación ocurrida en un tiempo relativamente corto, así como los sucesivos eventos de poliploidía que jugaron un papel clave en la evolución de esta familia (Lopez et al., 2017). Aunque no existen claras evidencias sobre el origen de esta familia de plantas, se cree que aparecieron hace aproximadamente 37 millones de años y se postula que se extendieron ocupando nuevos nichos ecológicos en hábitats secos creados mediante los cambios climáticos ocurridos durante el Mioceno (Franzke et al., 2016).

Dentro de esta familia, el género *Brassica* es el más importante desde un punto de vista agronómico y económico (Aires, 2015). Entre los usos más destacados de este género de plantas no solo se encuentra la producción de hortalizas, sino también su utilización para la obtención de condimentos, aceites o como alimento animal debido a su alto valor nutricional (Ali et al., 2011; Rakow, 2004). Diversos estudios también han demostrado que las especies del género *Brassica* presentan posibles aplicaciones en el campo de los combustibles renovables, pudiendo ser utilizados en la fabricación de biocombustibles (McVetty y Duncan, 2015; Onay y Koçkar, 2004). Además, se ha observado que las plantas del género *Brassica* presentan una alta tolerancia a determinados metales pesados, debida principalmente a la presencia de compuestos quelantes capaces de secuestrar estos metales. Por ello, en diversos estudios se ha sugerido un posible papel de estas plantas como fitorremediadoras (Mourato et al., 2015).

El género *Brassica* contiene 37 especies diferentes, destacando especialmente un grupo de seis especies interrelacionadas, de las cuales tres son diploides y difieren en su número de cromosomas: *B. nigra* (L.) Koch ($2n=16$), *B. oleracea* ($2n=18$) y *B. rapa* L. ($2n=20$). Las otras tres especies, *B. carinata* A. Braun ($2n=34$), *B. juncea* (L.) Czern. ($2n=36$) y *B. napus* L. ($2n=38$), presentan una dotación cromosómica procedente de la combinación de las tres especies diploides. Esta relación fue descrita por vez primera en 1935 por el botánico Nagaharu U, estableciendo lo que se conoce como el triángulo de U (Figura 3) (Gautam et al., 2014; Soengas et al., 2011). Se cree que el origen de las tres especies diploides (*B. nigra*, *B. oleracea* y *B. rapa*) ocurrió entre 4 y 8 millones de años atrás y fueron estas especies las primeras del género *Brassica* en ser domesticadas por el hombre hace varios miles de años. Mientras que *B. carinata*, *B. juncea* y *B. napus* son más jóvenes en términos evolutivos, apareciendo hace aproximadamente 10.000 años y, aunque fueron domesticadas por el hombre más tarde que las especies diploides, su

domesticación probablemente sigue siendo temprana en la evolución agraria de la humanidad. El hecho de que estas plantas fueran de las primeras en ser domesticadas por el hombre puede deberse a la gran variabilidad en los genomas de *Brassica*, haciendo que respondan de manera inusual ante la selección (McVetty y Duncan, 2015).

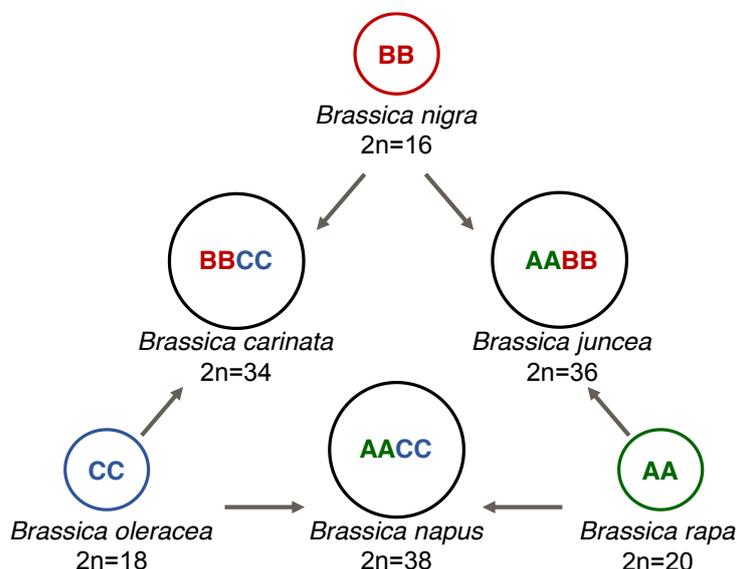


Figura 3. Relación genómica entre las 6 principales especies de *Brassica* cultivables (McVetty y Duncan, 2015).

3.2. Origen y cultivo del brócoli

Uno de los ejemplos más representativos de selección dentro del género *Brassica* es la especie *B. oleracea*, que comprende una serie de variedades entre las que se encuentra el brócoli (Branca, 2008). Dichas variedades hortícolas se originaron a partir de una especie de col silvestre (*B. oleracea* var. *oleracea*) (Figura 4), que es una planta herbácea procedente de regiones costeras del Mediterráneo, así como del norte de España, el oeste de Francia y el sur y suroeste de Gran Bretaña (Babula et al., 2007).

En sus poblaciones naturales, la col silvestre supone un excelente sistema modelo para investigar las interacciones planta-herbívoro mediadas por metabolitos secundarios (Newton et al., 2009). En este sentido, existen evidencias que indican que la abundancia de determinados herbívoros varía según el contenido en glucosinolatos entre las poblaciones de esta planta (Harvey et al., 2011; Newton et al., 2010). Además, se ha observado que la coloración de las hojas en la col silvestre está relacionada con su contenido en glucosinolatos, sugiriendo que dicha coloración puede indicar el nivel

defensivo de la planta y estos parámetros podrían ser detectados por determinados herbívoros (Green et al., 2015).

Las diferentes variedades o morfotipos dentro de la especie *B. oleracea* (Figura 4) se caracterizan por la selección del desarrollo de determinados órganos que tuvo lugar durante el proceso de domesticación del cultivo hace al menos 2.500 años (Babula et al., 2007; Cheng et al., 2016). Esta variabilidad fenotípica dentro de una misma especie podría ser debida a la plasticidad genómica que posee *B. oleracea*, presentando un alto nivel de duplicaciones ocurridas mediante una serie de eventos de poliploidía, así como múltiples reordenamientos genómicos (Lukens et al., 2004; Salmon et al., 2008). Además, se ha sugerido que el alto grado de metilación en el genoma de *B. oleracea* podría ser otro mecanismo de regulación responsable de dicha variabilidad fenotípica (Salmon et al., 2008).

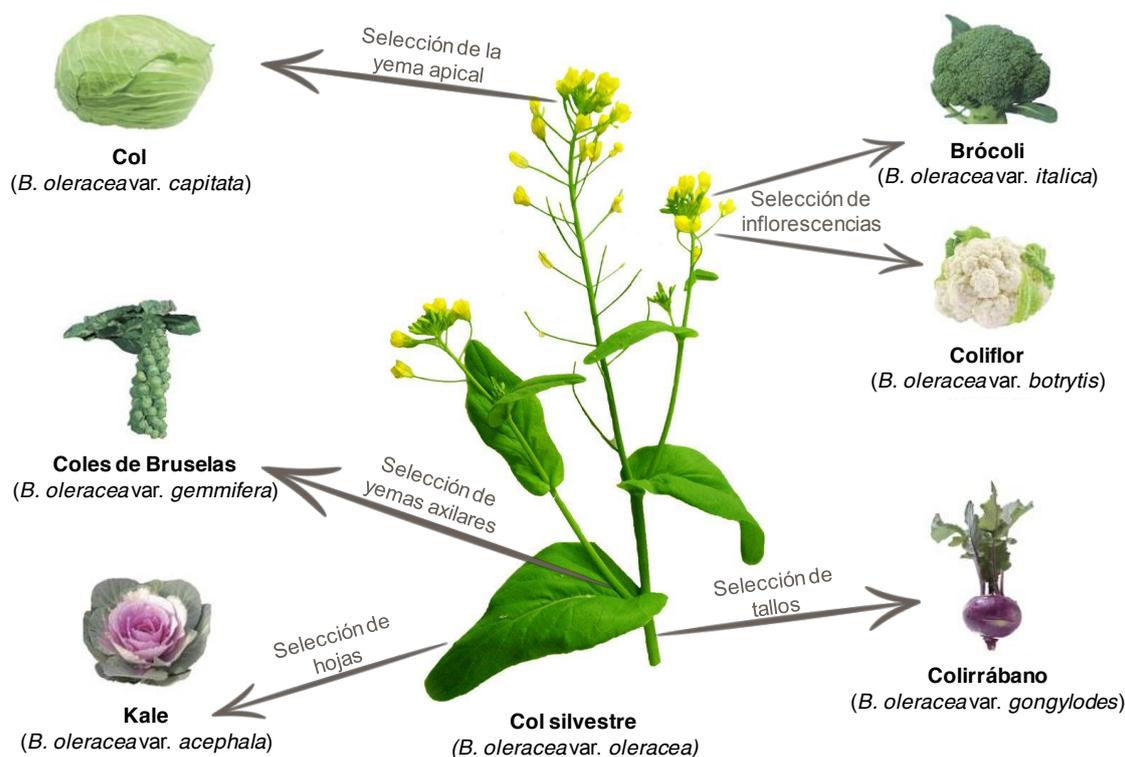


Figura 4. Variedades o morfotipos más representativos derivados de selección artificial de *B. oleracea* var. *oleracea*. Adaptado de Cheng et al. (2016) y «Sissi 100% Organic», s. f.

En el brócoli, la parte comercializable son las inflorescencias que emergen del meristemo apical del tallo de la planta (Farnham y Björkman, 2011a). Las inflorescencias en brócoli han sido descritas como un corimbo, una panícula corimbosa o una panícula racemosa modificada y, en el momento de su cosecha, consisten en un gran número de

flores funcionales inmaduras, un tallo floral y brácteas más pequeñas y simples que las hojas vegetativas (Buck, 1956). Tanto el brócoli como la coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*) presentan hipertrofia en las inflorescencias, sin embargo, la diferencia radica en que esta hipertrofia ocurre en diferentes fases del desarrollo de la planta. Mientras que el brócoli presenta una gran cantidad de yemas florales completamente diferenciadas, la hipertrofia en la inflorescencia de la coliflor ocurre en un estado del desarrollo más temprano, presentando una proliferación de los meristemas florales, de los cuales aproximadamente el 90 % no llegará a formar flores funcionales (Branca, 2008; Labate et al., 2006).

El desarrollo y diversificación de las primeras formas de brócoli tuvo lugar principalmente en la península Itálica hace aproximadamente 2.000 años (Buck, 1956). Fue durante el siglo XVII cuando el brócoli comenzó a cultivarse en Gran Bretaña y en los países del norte de Europa, así como en España en el siglo XVIII. Durante este periodo se establecieron los diferentes cultivares del brócoli en función de parámetros como el periodo de cosecha o la coloración. Posteriormente, el cultivo de brócoli fue introducido en Norte América durante el siglo XIX por la comunidad italiana emigrante, y finalmente, fue extendido por todo el mundo durante el siglo XX, sobre todo durante el periodo colonial (Branca, 2008). En España, el cultivo de brócoli a gran escala comenzó al principio de la década de 1970, producido y exportado por empresas hortofrutícolas de la Comunidad Valenciana, para extenderse posteriormente a otras regiones como Murcia, Andalucía, Extremadura o Navarra (Maroto et al., 1996).

En el año 2017, los principales países productores de brócoli y coliflor fueron China (10.449.387 toneladas) e India (8.557.000 toneladas) («FAOSTAT», 2017). En España, gran parte de la producción de brócoli tiene lugar en el sureste del país, concretamente la Región de Murcia contó con el 36 % de la superficie de cultivo de esta hortaliza (12.088 ha) en el año 2018, así como el 37 % de la producción a nivel nacional (209.122 toneladas) («Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación», 2018). Cabe destacar también la elevada exportación de coles (brócoli, coliflor y otras) que tiene lugar en la Región de Murcia, llegando a alcanzar 339.286 toneladas en el año 2018 (Figura 5) («Proexport», 2018).

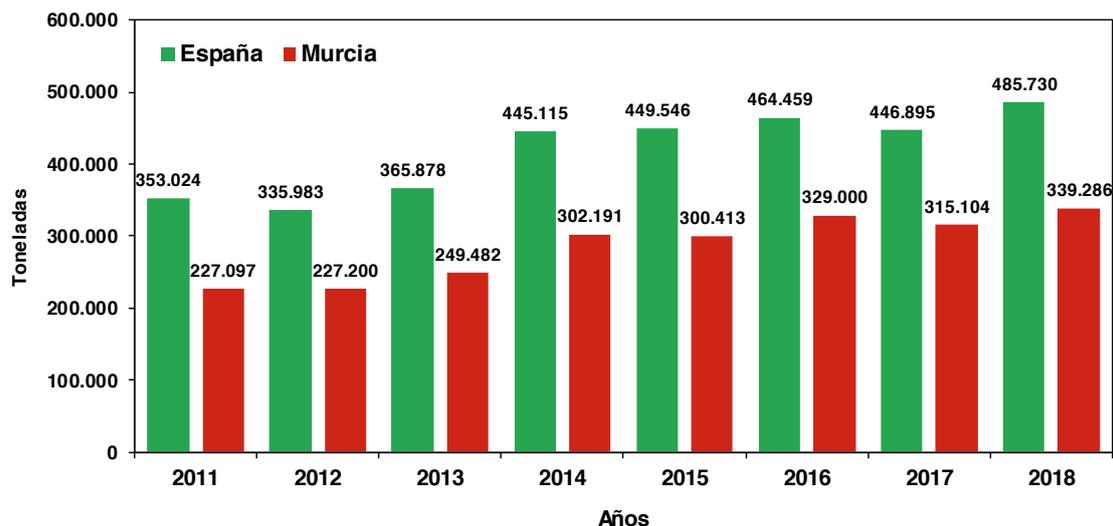


Figura 5. Toneladas de coles (brócoli, coliflor y otras) exportadas en España y Murcia. («Proexport», 2018).

Una de las razones por las que el brócoli supone uno de los principales cultivos en la Región de Murcia podría ser la moderada tolerancia que presenta frente a condiciones salinas (Sánchez-Monedero et al., 2004), permitiendo ser cultivado cerca de regiones costeras. Además, el brócoli presenta ciertos requerimientos de temperatura que varían durante su desarrollo. Mientras que las temperaturas de 30°C o superiores suponen condiciones óptimas para el desarrollo vegetativo del brócoli, se sabe que, en general, se necesitan condiciones frías (por debajo de 23°C) para la inducción y el mantenimiento de la vernalización que permite el desarrollo normal de la pella. Una vez que el desarrollo floral del brócoli ha comenzado, una temperatura superior a 30°C es capaz de detener dicho proceso (Farnham y Björkman, 2011a). Estos requerimientos de temperatura hacen que, generalmente, el cultivo de brócoli sea apto durante la primavera y el otoño en regiones templadas, así como durante el invierno en lugares en los que esta estación es relativamente suave (Farnham y Björkman, 2011b).

3.3. Composición nutricional del brócoli

Hoy en día, la demanda del cultivo de brócoli se atribuye fundamentalmente a sus propiedades beneficiosas y su alto valor nutritivo (Lee et al., 2006). Entre las propiedades nutricionales que presenta el brócoli destacan su bajo contenido calórico y una gran cantidad de vitaminas, minerales y fibra (Mukherjee y Mishra, 2012; Pereira et al., 2002) (Tabla 1). Además, el brócoli presenta una compleja mezcla de compuestos bioactivos,

siendo los glucosinolatos, los compuestos fenólicos y los carotenoides los grupos de compuestos más destacados (López-Berenguer et al., 2009). Por todo ello, se ha considerado al brócoli como un superalimento capaz de prevenir enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o la diabetes (Ares et al., 2013; Jeffery y Araya, 2009; Moreno et al., 2006).

Tabla 1. Composición nutricional del brócoli (Mukherjee y Mishra, 2012).

Valor nutricional	(/100 g)	Vitaminas	(/100 g)
Energía	34 kcal	Vitamina A	
Carbohidratos	6,64 g	β-caroteno	361 µg
Proteínas	2,82 g	β-criptoxantina	1 µg
Grasas	0,37 g	Luteína + zeaxantina	1403 µg
Fibra	2,60 g	Vitaminas del grupo B	
		Folatos	63 µg
		Niacina	0,639 mg
		Ácido pantoténico	0,573 mg
		Piridoxina	0,175 mg
		Riboflavina	0,117 mg
		Tiamina	0,071 mg
		Vitamina C	89,2 mg
		Vitamina K	0,17 mg
		Vitamina E	101,6 µg
Minerales	(/100 g)		
Calcio	47 mg		
Cobre	0,049 mg		
Hierro	0,73 mg		
Magnesio	21 mg		
Manganeso	0,21 mg		
Selenio	2,5 µg		
Zinc	0,41 mg		
Sodio	33 mg		
Potasio	316 µg		

Múltiples estudios han demostrado que el método de cocinado del brócoli afecta significativamente a su contenido en nutrientes y compuestos bioactivos. En este sentido, se ha observado que el brócoli cocinado al vapor durante 10 minutos mantiene intactos, e incluso más disponibles para su absorción, los glucosinolatos, las vitaminas C y E, los compuestos fenólicos y los carotenoides como el β-caroteno o la luteína. Por el contrario, la cocción del brócoli durante 5 minutos resultó en la pérdida de gran parte de los glucosinolatos, los compuestos fenólicos y la vitamina C, que se liberaron en el agua de la cocción (Gliszczynska-Świgło et al., 2006). También se ha demostrado que el uso del microondas para cocinar el brócoli provocó una gran degradación de vitamina C, así como la pérdida de compuestos fenólicos y glucosinolatos en el agua de la cocción (López-Berenguer et al., 2007). Por todo ello, la mayoría de estudios coinciden en que los tiempos

largos de cocinado y el uso de agua durante el proceso deben ser evitados para garantizar una mayor estabilidad de los nutrientes y los compuestos bioactivos del brócoli (Vallejo et al., 2003b).

4. Compuestos bioactivos en brócoli

Los beneficios del consumo de brócoli para la salud son múltiples y no solo radican en su alta concentración de vitaminas o minerales, sino también en su compleja mezcla de compuestos fitoquímicos con diferentes actividades fisiológicas (Cartea et al., 2011; Moreno et al., 2006). Numerosos estudios han evidenciado los efectos beneficiosos que presenta el consumo de brócoli, entre los que destacan un menor riesgo de padecer cáncer (Jeffery y Araya, 2009; Koh et al., 2009) o enfermedades asociadas a la edad como la degeneración macular (Mukherjee y Mishra, 2012; Singh et al., 2007). Debido a su papel fisiológico clave en las respuestas de defensa en brócoli, así como por la relevancia que presentan en este trabajo de investigación, cabe destacar los glucosinolatos y los compuestos fenólicos entre los metabolitos secundarios más importantes del brócoli.

4.1. Glucosinolatos

Los glucosinolatos son compuestos sulfurados característicos de la familia de las brassicáceas, aunque su presencia también se ha descrito en otras familias del orden Brassicales (Brown et al., 2003), así como en la familia Putranjivaceae (Stauber et al., 2012). Químicamente, estos compuestos están formados por un motivo β -tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral procedente de aminoácidos (Vig et al., 2009). Dependiendo del aminoácido a partir del que se forme la cadena lateral, podemos agrupar a los glucosinolatos en alifáticos (derivados de alanina, leucina, isoleucina, metionina o valina), aromáticos (derivados de fenilalanina o tirosina) o indólicos (derivados de triptófano) (Figura 6) (Halkier y Gershenzon, 2006).

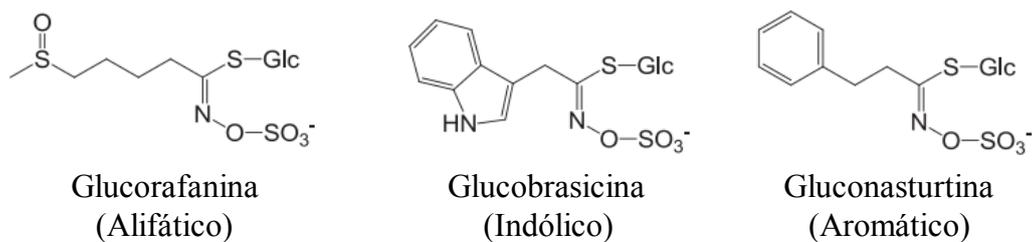


Figura 6. Ejemplos más representativos de los tres tipos de glucosinolatos: alifáticos, indólicos y aromáticos. Adaptado de Ishida et al. (2014).

4.1.1. Biosíntesis y distribución de los glucosinolatos en plantas

En general, la ruta biosintética de los glucosinolatos comprende tres etapas:

- Elongación de la cadena lateral del precursor aminoacídico (solo en el caso de metionina y fenilalanina). La primera reacción de esta etapa tiene lugar en el citosol, mientras que el resto de la elongación de la cadena lateral se produce en los cloroplastos.
- Formación de la estructura central del glucosinolato. Algunos estudios indican que esta etapa y el resto de la biosíntesis de los glucosinolatos ocurren en el citosol de la célula (Sønderby et al., 2010). Para que tenga lugar la formación de la estructura central de los glucosinolatos es necesario un donador de azufre, el cual se pensaba que se trataba de la cisteína, sin embargo, estudios recientes han sugerido que es más probable que el donador de azufre sea el GSH (Geu-Flores et al., 2011).
- Modificaciones secundarias de la cadena lateral. Esta etapa, junto a la primera, son las responsables de la gran variedad estructural existente entre los glucosinolatos, con más de 120 estructuras conocidas (Sønderby et al., 2010).

Diferentes estudios sugieren que los glucosinolatos se localizan en la vacuola de las células vegetales (Andréasson y Jørgensen, 2003) y su distribución varía según el órgano y la edad de la planta (Brown et al., 2003), siendo más abundantes en plantas jóvenes en el caso del brócoli (Maldini et al., 2012). Además, el contenido en glucosinolatos varía según diferentes factores como el genotipo, las condiciones ambientales o el procesado de la planta. Por ejemplo, un estudio reveló que el contenido en glucosinolatos en 50 cultivares de brócoli varió, en mayor medida, para los glucosinolatos alifáticos (3,0 – 31,4 $\mu\text{moles/g}$ peso seco) que para los glucosinolatos indólicos (0,4 – 6,2 $\mu\text{moles/g}$ peso seco) (Jeffery et al., 2003). En relación al periodo de postcosecha, Vallejo et al. (2003a) observaron que, tras mantener al brócoli durante 7 días a 1°C, el contenido en glucorafanina disminuyó un 48 % (de 3,1 a 1,6 $\mu\text{moles/g}$ peso seco). Sin embargo, la mayor pérdida se observó en el caso de los glucosinolatos indólicos, con un descenso del 62 % del contenido en glucobrasicina (de 7,0 a 2,6 $\mu\text{moles/g}$ peso seco) y del 96 % del contenido en neoglucobrasicina (de 12,0 a 0,5 $\mu\text{moles/g}$ peso seco).

El perfil de glucosinolatos puede resultar característico para cada crucífera e incluso para cada variedad en particular, dentro de la especie *B. oleracea* (Kushad et al., 1999). Mientras que todas las verduras crucíferas contienen el glucosinolato indólico glucobrasicina, la mayoría también contienen grandes cantidades de sinigrina. Sin embargo, en el brócoli, el contenido en sinigrina es más bajo y el glucosinolato más abundante es la glucorafanina, que normalmente constituye el 50 % del total de glucosinolatos (Jeffery et al., 2003). Además, se han descrito cambios en los perfiles de glucosinolatos en plantas de brócoli durante los diferentes estados de maduración. En este sentido, en la Tabla 2 se puede observar cómo el contenido en glucosinolatos varía en función del estado de maduración, tanto en plántulas de 3 y 10 días de edad (Maldini et al., 2012), como en inflorescencias de brócoli (Kushad et al., 1999).

Tabla 2. Abundancia relativa expresada en porcentaje del contenido en glucosinolatos en diferentes estados de maduración del brócoli (Kushad et al., 1999; Maldini et al., 2012).

Naturaleza	Glucosinolato	Abundancia relativa (%)		
		Plántulas 3 días	Plántulas 10 días	Inflorescencias
Alifático	Glucorafanina	46,1	40,6	55,5
	Glucoiberina	8,9	7,5	0,7
	Progoitrina	4,01	5,35	7,8
	Sinigrina	2,00	3,74	0,8
	Glucoalisina	1,56	3,21	1,6
	Gluconapina	2,00	3,74	7,8
	Glucoiberiverina	1,56	2,67	0,0
	Glucoerucina	10,02	6,42	0,0
	Gluconapoleiferina	6,68	6,42	5,5
	Glucocheirolina	1,78	2,67	0,0
	Glucobrasicanapina	0,0	0,0	2,3
Indólico	Glucobrasicina	2,23	3,21	8,6
	4-hidroxi glucobrasicina	7,57	3,74	1,6
	4-metoxi glucobrasicina	3,79	4,81	3,1
	Neoglucobrasicina	1,78	5,88	1,6
Aromático	Gluconasturtina	0,0	0,0	3,1
Referencias		Maldini et al. (2012)		Kushad et al. (1999)

4.1.1. Funciones de los glucosinolatos en plantas

Actualmente se conoce que la mayor parte de la actividad biológica que presentan los glucosinolatos procede de sus productos de hidrólisis. La enzima mirosinasa (EC 3.2.3.1) es la encargada de hidrolizar los glucosinolatos, transformándolos en una serie

de productos hidrolíticos como son los isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos, epitionitrilos u oxazolidín-tionas (Rask et al., 2000) (Figura 7). La mirosinasa se encuentra en las células vegetales en compartimentos celulares diferentes a los glucosinolatos; sin embargo, cuando las células sufren un daño, por la masticación de herbívoros, por ejemplo, la mirosinasa se libera y entra en contacto con los glucosinolatos dando lugar a los productos de hidrólisis (Vig et al., 2009). Estos productos de hidrólisis presentan diversas funciones en las plantas, siendo agentes tóxicos frente a una extensa variedad de herbívoros (Textor y Gershenzon, 2009), presentando actividad antifúngica y antibacteriana (Aires et al., 2009; Ishida et al., 2014) o incluso se ha determinado que tienen un papel importante en la defensa de la planta frente a estreses abióticos tales como la salinidad, la sequía o las altas temperaturas (Martínez-Ballesta et al., 2013).

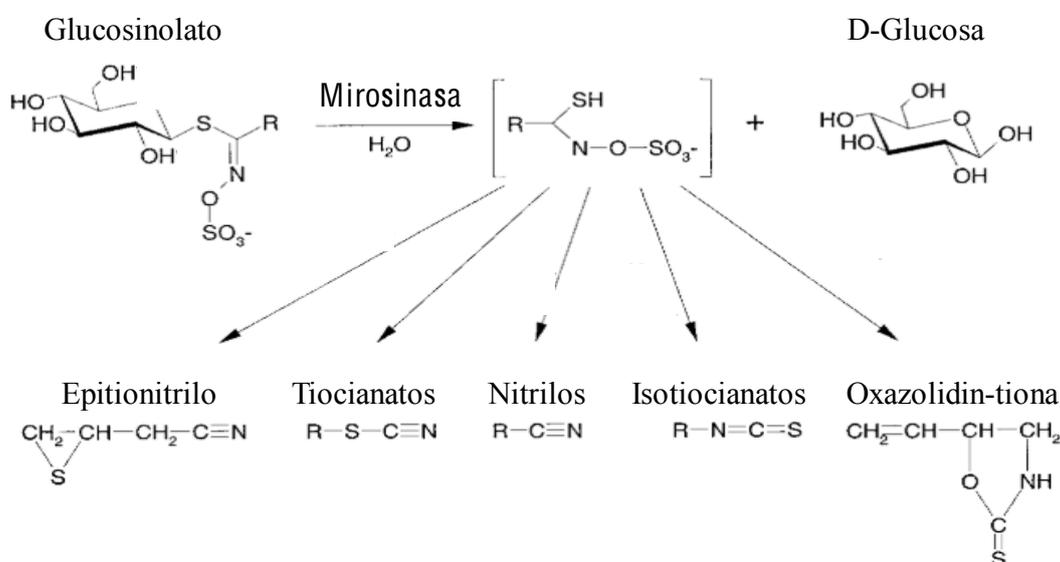


Figura 7. Estructura general de los glucosinolatos (siendo “R” la cadena lateral procedente de aminoácidos) transformados mediante la acción de la mirosinasa en una aglicona inestable y, posteriormente, en los diferentes productos de hidrólisis. Adaptado de Rask et al. (2000).

4.1.2. Papel fisiológico de los glucosinolatos en humanos

Además de las múltiples funciones que presentan los productos de hidrólisis de los glucosinolatos en las plantas, se sabe que, en concreto, los isotiocianatos tienen actividad biológica en humanos (Guzmán-Pérez et al., 2016). La hidrólisis de los glucosinolatos en el organismo humano no puede producirse debido a la ausencia de la enzima mirosinasa. Sin embargo, en la microflora intestinal, algunas bacterias del género

Bifidobacterium son capaces de realizar esta degradación de los glucosinolatos hacia sus productos de hidrólisis (Cheng et al., 2004).

Los isotiocianatos han sido ampliamente estudiados debido a su potente capacidad antioxidante, pudiendo actuar de manera directa neutralizando radicales libres (Barillari et al., 2005). Dentro de los isotiocianatos destaca el sulforafano (derivado del glucosinolato glucorafanina), que también es considerado como un antioxidante indirecto, debido a su capacidad de activar genes que codifican enzimas de fase II como las GSTs o la quinona óxidoreductasa (NQO1), las cuales son importantes en la detoxificación de grupos electrófilos y en la protección frente al estrés oxidativo (Ishida et al., 2014). La inducción de estas enzimas es posible gracias a la activación del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), el cual es un factor de transcripción que interacciona con el elemento de respuesta antioxidante (ARE), activando la transcripción de una serie de genes que codifican enzimas de fase II. En condiciones normales, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra inactivado en el citoplasma por una proteína reguladora rica en cisteína llamada Keap1, lo cual conduce a la poliubiquitinación y posterior degradación de Nrf2. El sulforafano actúa reaccionando con ciertos grupos tiol de los residuos de cisteína de Keap1, liberando a Nrf2 que se transporta al núcleo, donde interacciona con ARE para activar la transcripción de genes que codifican enzimas de fase II (Bai et al., 2015) (Figura 8A).

Sin embargo, la activación de Nrf2 mediada por sulforafano y otros isotiocianatos también puede estar modulada indirectamente por una serie de quinasas, incluyendo las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como ERK, JNK y p38MAPK (Fuentes et al., 2015). Alternativamente, el sulforafano puede activar a Nrf2 mediante una fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (AKT), así como mediante la proteína quinasa C (PKC). En cualquiera de los casos, la ruta concluye con la activación de Nrf2 y la inducción de la transcripción de genes que codificarán enzimas capaces de reducir el estrés oxidativo (Bai et al., 2015) (Figura 8B).

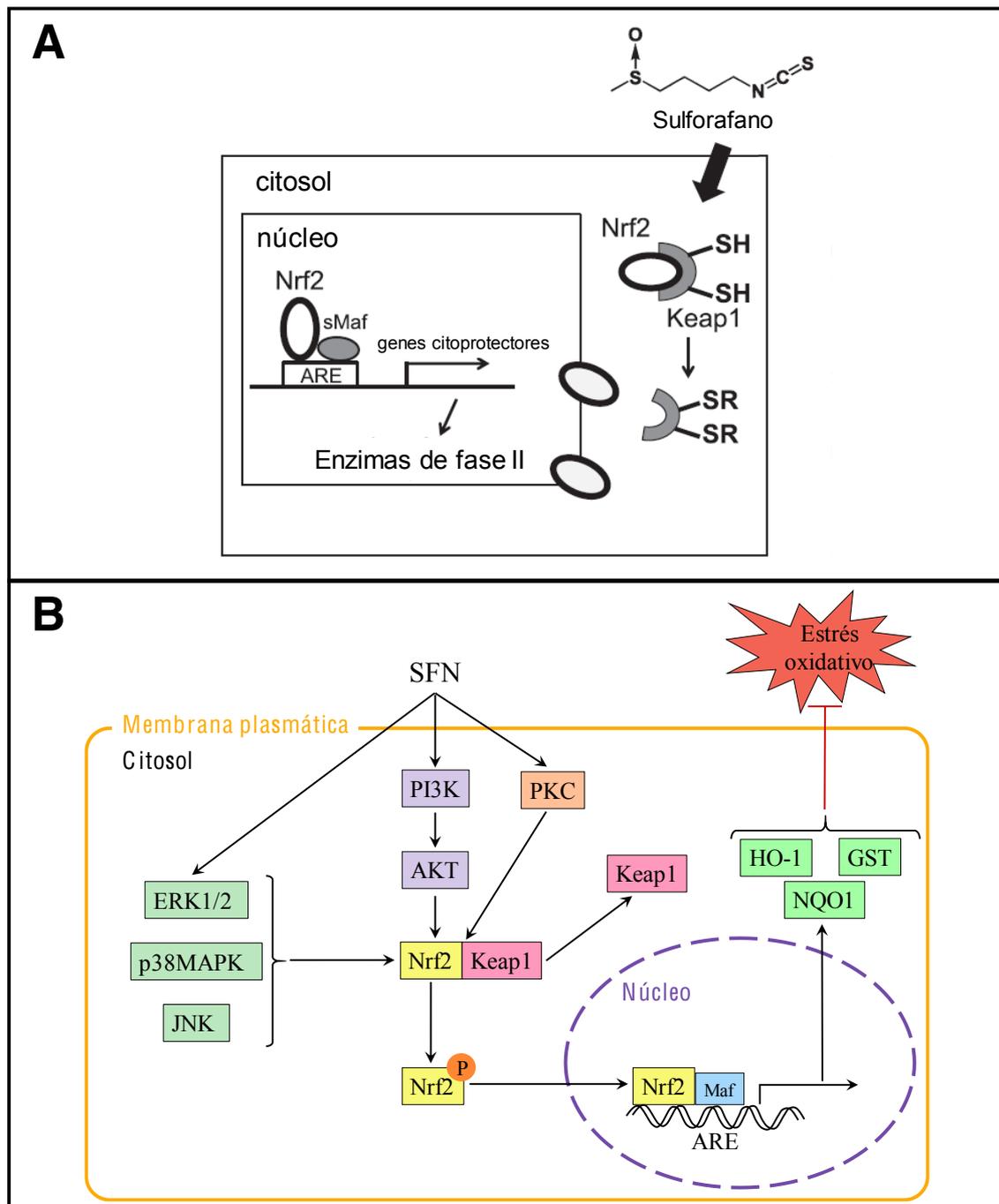


Figura 8. A. Esquema de la activación directa de la transcripción de enzimas de fase II mediante la acción del sulforafano. Cuando el sulforafano modifica los residuos de cisteína de la proteína Keap1 en el citosol, Nrf2 se transloca al núcleo formando un heterodímero con pequeños factores de transcripción de tipo Maf e interactuando con el elemento de respuesta antioxidante (ARE), para finalmente activar la maquinaria de transcripción de genes que codifican enzimas de fase II. Adaptado de Ishida et al. (2014). B. Activación de Nrf2 mediante sulforafano (SFN) a través de diferentes vías: proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como la proteína kinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2), la kinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la p38MAPK; fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína kinasa B (AKT); y la proteína kinasa C (PKC).

Finalmente, Keap1 libera a Nrf2 que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) y transcribe genes que codifican enzimas como la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la quinona óxidorreductasa 1 (NQO1) o glutatión S-transferasas (GST) (Bai et al., 2015).

En las células del endotelio vascular, esta misma ruta de activación de Nrf2 mediada por el sulforafano conduce a la activación de genes que codifican enzimas capaces de inhibir ciertos factores proinflamatorios (Vazquez-Prieto y Miatello, 2010). Zakkar et al. (2009) observaron que el sulforafano actuaba en las células endoteliales de ratones vía Nrf2, inhibiendo a la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), que es un factor proinflamatorio. Debido a las propiedades antiinflamatorias que presenta el sulforafano sobre el tejido vascular, diversos estudios han demostrado su posible papel en la prevención contra enfermedades cardiovasculares. De hecho, este compuesto fue capaz de prevenir enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis en ratas propensas a sufrir ataques de hipertensión espontáneos, ya que el sulforafano logró disminuir el estrés oxidativo en los tejidos cardiovasculares y del riñón de estos animales (Wu et al., 2004). Resultados similares fueron descritos por Senanayake et al. (2012), quienes observaron una disminución de la presión sanguínea y una mitigación de patologías renales en los mismos modelos animales. En lo relativo a estudios epidemiológicos en humanos, se ha visto que la ingesta de brócoli con alto contenido en glucorafanina indujo una reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre (Armah et al., 2015).

La función protectora de los isotiocianatos frente al desarrollo del cáncer ha sido ampliamente estudiada (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012; Ishida et al., 2014; Vig et al., 2009). Esta función protectora se debe en parte a la inducción de enzimas de fase II anteriormente descrita, pero también se produce gracias a otros mecanismos:

- **Detención del ciclo celular en fase G2/M.** Varios estudios han demostrado que los isotiocianatos producen una parada del ciclo celular y/o la inducción de la apoptosis en líneas celulares tumorales. Cheng et al. (2016) mostraron que el sulforafano fue capaz de detener el ciclo celular de células de cáncer cervical mediante la inhibición del gen que codifica la ciclina B1. En otro estudio realizado en células de cáncer de próstata se observó una parada del ciclo celular en fase G2/M y una inducción de la apoptosis provocadas por la aplicación de alil-isotiocianato (Xiao et al., 2003).

- **Regulación epigenética.** Las variaciones epigenéticas como la modificación de las histonas pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Los derivados de los glucosinolatos, como el sulforafano o el fenetil isotiocianato, tienen actividad inhibidora de las histona deacetilasas (Fuentes et al., 2015). Por otro lado, la metilación del ADN causada por una sobreexpresión de ADN metiltransferasas que silencian genes supresores de tumores, también puede promover el inicio de la carcinogénesis. Diversos estudios han demostrado que los isotiocianatos presentan actividad inhibidora de las ADN metiltransferasas en diferentes modelos de cáncer de mama, colon y próstata (Novío et al., 2019).
- **Modulación hormonal.** Ciertos tipos de cáncer, como el de mama o próstata, están muy relacionados con la desregulación de las señales hormonales. Kang et al. (2009) demostraron que el bencil- y el fenetil isotiocianato fueron capaces de inhibir el crecimiento estimulado por estrógenos y la reducción de los niveles de expresión del receptor estrogénico en células de cáncer de mama.
- **Inhibición de la angiogénesis y la metástasis.** La angiogénesis y la metástasis son procesos clave en el desarrollo de un tumor maligno. Los isotiocianatos actúan como inhibidores de la angiogénesis mediante diferentes vías, como puede ser la reducción de la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- κ B). Además, la tubulina, una proteína requerida para la morfogénesis y la migración celular durante la angiogénesis, también es reconocida como diana por los isotiocianatos, inhibiendo su polimerización e induciendo su degradación en células tumorales. En relación a la metástasis, también se ha observado que los isotiocianatos inhiben la migración celular *in vitro* y reducen la metástasis *in vivo* mediante la inhibición de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y la sobreexpresión de inhibidores de MMP (Navarro et al., 2011).

Por otro lado, el estrés oxidativo puede ser uno de los causantes de la diabetes tipo 2, en cuya enfermedad, la resistencia a la insulina no permite reprimir la gluconeogénesis. Los resultados de un estudio realizado con líneas celulares humanas sugerían que el bencil

isotiocianato (derivado del bencil glucosinolato) podría desempeñar un papel en la prevención de la diabetes tipo 2 debido a su efecto inhibidor de la gluconeogénesis y la activación de los sistemas de defensa antioxidantes (Guzmán-Pérez et al., 2016). Similarmente, un estudio clínico realizado en pacientes de diabetes tipo 2 mostró que el consumo de brotes de brócoli (ricos en glucorafanina) provocaba efectos beneficiosos, ya que se reducía el nivel de estrés oxidativo, mediante el incremento de la capacidad antioxidante en el suero y la reducción de los niveles de LDL en sangre (Bahadoran et al., 2011).

Paralelamente, los isotiocianatos presentan efectos protectores contra enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. De hecho, el sulforafano fue capaz de proteger la retina frente a daños provocados por la luz en ratones, activando la tiorredoxina mediante la secuencia ARE (Tanito et al., 2005). Este efecto protector también fue descrito en modelos de animales con isquemia cerebral, lesiones cerebrales, hemorragias intracerebrales y lesiones de la médula espinal (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).

Por otra parte, los isotiocianatos también poseen propiedades antimicrobianas, ya que se ha observado que el alil isotiocianato es eficaz actuando contra patógenos humanos como *Salmonella* (Chen et al., 2012). Además, el sulforafano presenta un efecto protector contra úlceras de estómago, siendo capaz de reducir la colonización gástrica de *Helicobacter pylori* y/o reduciendo la inflamación asociada a esta bacteria (Fahey et al., 2013).

4.2. Compuestos fenólicos

El grupo de los compuestos fenólicos consta de más de 8.000 estructuras diferentes ampliamente distribuidas por todo el reino vegetal. Estos metabolitos secundarios se caracterizan por poseer, al menos, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos (Cartea et al., 2011). Los compuestos fenólicos son muy diversos y divergen en tamaño y estructura, pudiéndose agrupar desde estructuras simples, de bajo peso molecular como los ácidos hidroxibenzoicos (Figura 9A), hasta largos polímeros de peso molecular elevado, como es el caso de los taninos condensados (Tomás-Barberán y Espín, 2001).

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son el grupo de mayor importancia debido a su abundancia en los alimentos y sus propiedades beneficiosas para la salud (Panche et al., 2016). Todos los flavonoides comparten una estructura central básica, que consiste en dos anillos aromáticos de 6 carbonos (A y B) y un anillo heterocíclico (C) que contiene un átomo de oxígeno (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011) (Figura 9A). En el brócoli, los flavonoides más abundantes son los flavonoles quercetina y kaempferol (Koh et al., 2009), los cuales se encuentran comúnmente conjugados con azúcares y ácidos orgánicos (Cartea et al., 2011; Moreno et al., 2006). Esta conjugación ocurre con más frecuencia en la posición 3 del anillo C, pero también se suele dar en las posiciones 5, 7, 3', 4' y 5' (Cartea et al., 2011) (Figura 9B).

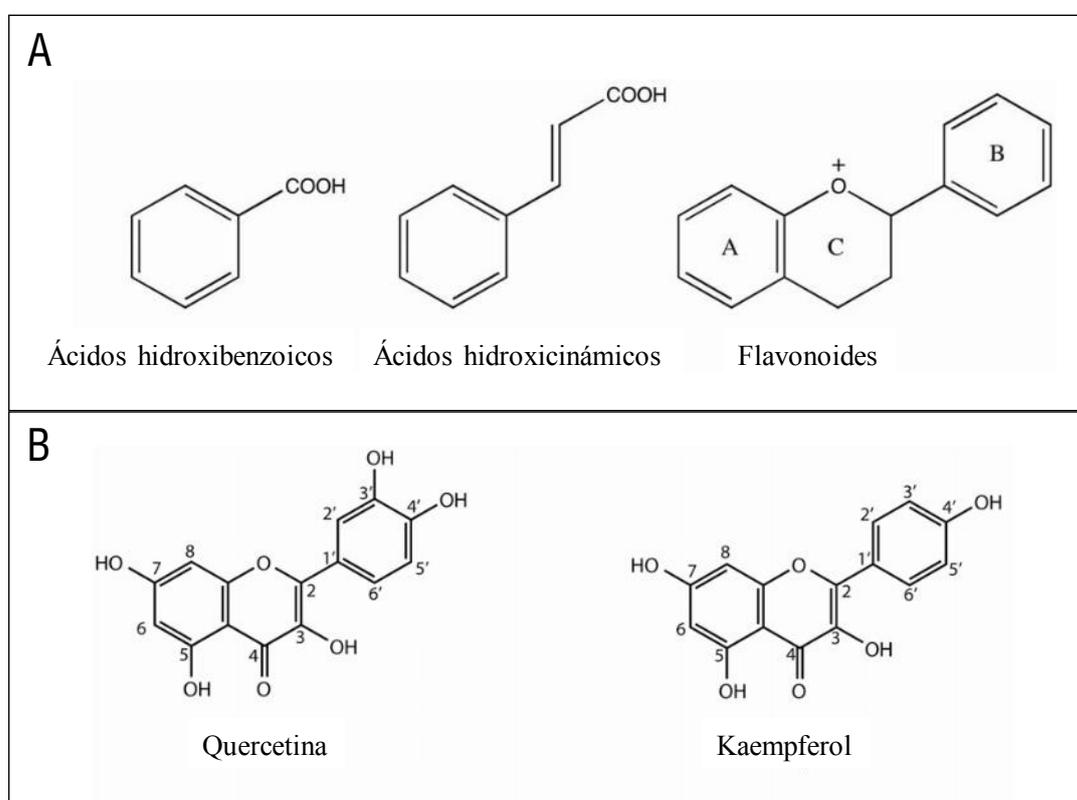


Figura 9. A. Estructura básica de ácidos fenólicos y flavonoides. Adaptado de Khoddami et al. (2013). B. Flavonoides más abundantes en brócoli. Adaptado de Cartea et al. (2011).

Generalmente, el contenido en flavonoides en las pellas comerciales del brócoli depende de muchos factores, como pueden ser el genotipo, las condiciones ambientales, los métodos de producción agrícola o el manejo y su transporte después de la cosecha (Koh et al., 2009; Neugart et al., 2018). Por ejemplo, Khan et al. (2011) observaron un aumento significativo del contenido en kaempferol en brócoli sometido a estrés hídrico. Vallejo et al. (2003a) estudiaron los cambios en el contenido en flavonoides durante el

periodo postcosecha, mediante el análisis de inflorescencias de brócoli mantenidas durante 7 días a 1°C. Estos autores observaron una disminución del contenido en flavonoides de hasta el 61 % con respecto al día de la cosecha (Vallejo et al., 2003a).

4.2.1. Biosíntesis y metabolismo de los compuestos fenólicos

La biosíntesis, tanto de los flavonoides como del resto de compuestos fenólicos, comienza generalmente a partir de la fenilalanina (aunque también se pueden formar a partir de tirosina), que procede, a su vez, de la ruta del ácido siquímico (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). La fenilalanina se desamina para formar ácido *trans*-cinámico y un ion amonio mediante la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Cochrane et al., 2004) (Figura 10). Este primer paso de la ruta biosintética supone un punto de regulación clave entre el metabolismo primario y secundario de las plantas (Kim y Hwang, 2014).

Desde su descubrimiento en 1961, la enzima PAL ha sido extensamente estudiada y se ha descrito su presencia en plantas superiores, así como en algunos hongos y ciertas bacterias, pero no en animales (Zhang y Liu, 2015). Aunque existen excepciones, la mayoría de estudios coinciden en que el peso molecular de esta enzima varía entre 300 y 340 kDa, siendo normalmente un homotetrámero, aunque también se han descrito enzimas PAL heterotetraméricas (Hyun et al., 2011). La actividad de la enzima PAL está fuertemente regulada por fitohormonas como el etileno, el ácido salicílico o los jasmonatos, así como por una serie de factores ambientales, incluyendo el ataque mediado por patógenos, la rotura tisular, la radiación ultravioleta, la exposición a metales pesados, las bajas temperaturas o la escasez de nutrientes (Dehghan et al., 2014; Zhang y Liu, 2015).

Después de la actuación de la enzima PAL, el ácido *trans*-cinámico se metaboliza en diversos metabolitos fenilpropanoides como el ácido *p*-cumárico (Cochrane et al., 2004). Siguiendo la ruta fenilpropanoide, los flavonoides son sintetizados por la chalcona sintasa mediante la condensación del *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA, dando lugar a la naringenina, que es una chalcona. Posteriormente, una isomerasa transforma las chalconas en flavanonas y, a partir de este punto, la ruta biosintética es diferente para cada tipo de flavonoide. Los flavonoles quercetina y kaempferol derivan de las flavanonas mediante la acción de una flavanona 3-hidroxilasa, produciendo dihidroflavonoles que después serán transformados en flavonoles gracias a la acción de

una flavonol sintasa y finalmente estos metabolitos serán glucosilados (Dao et al., 2011) (Figura 10).

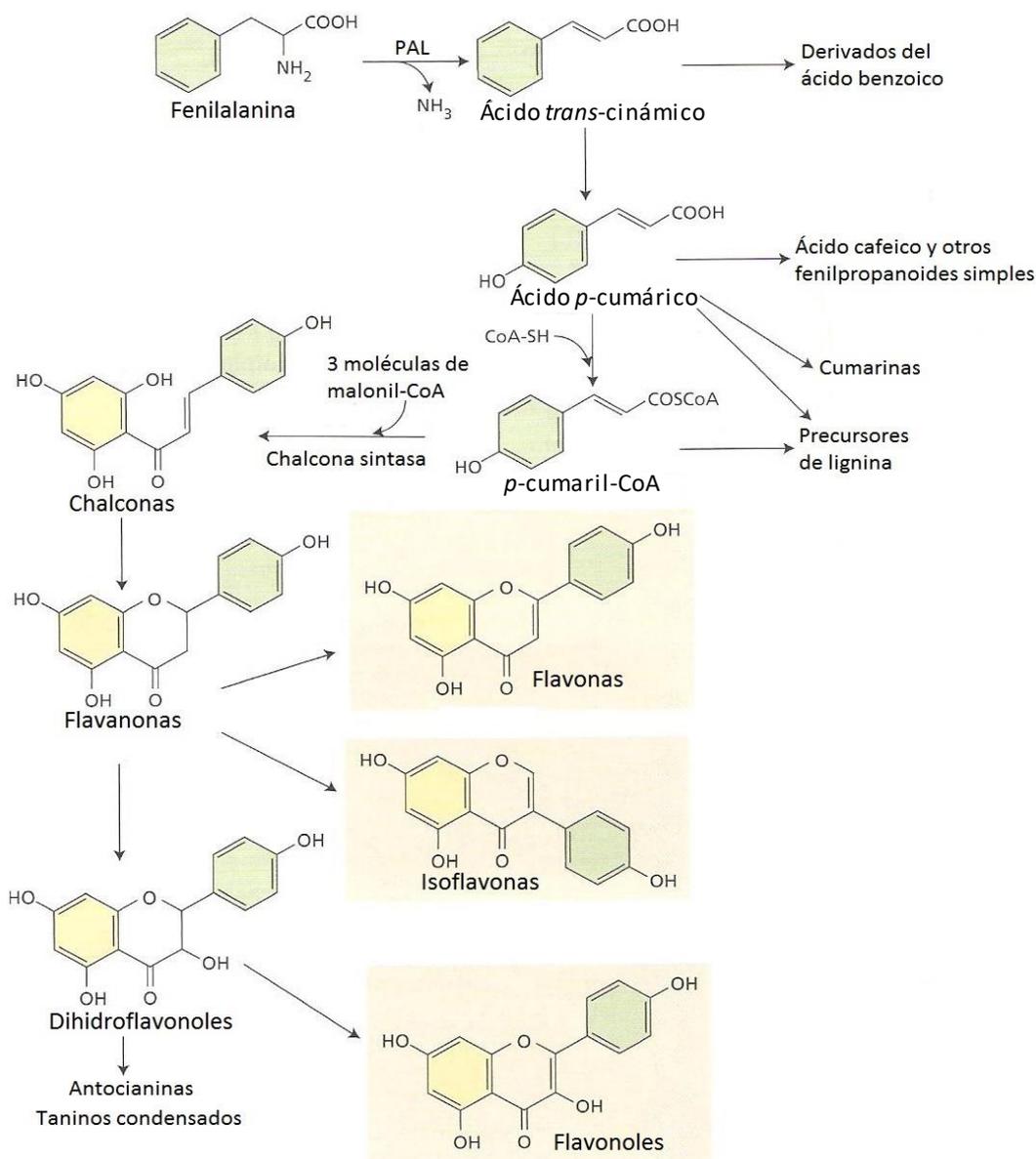


Figura 10. Ruta biosintética de los flavonoides y otros compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina. PAL, fenilalanina amonio liasa. Adaptado de Taiz y Zeiger (2010).

El proceso de degradación de los compuestos fenólicos causa uno de los mayores problemas en la industria alimentaria, ocasionando pérdidas que pueden ser superiores al 50 % en el mercado de frutas y verduras. Este fenómeno, conocido como “pardeamiento enzimático”, se produce debido a la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO). En general, los compuestos fenólicos se encuentran localizados en las vacuolas de las células vegetales, mientras que la PPO se localiza en los plastidios. Cuando se produce un daño

tisular, los compuestos fenólicos entran en contacto con la PPO, dando como resultado la oxidación de estos metabolitos hasta su correspondiente quinona. Este proceso se traduce finalmente en un efecto negativo en el color, el sabor y el valor nutricional de ciertas frutas y verduras (Ferreira Holderbaum et al., 2010).

Las quinonas formadas mediante la acción de la enzima PPO son altamente reactivas y tienen tendencia a formar polímeros (Gawlik-Dziki et al., 2007), pudiendo unirse a proteínas y reduciendo su digestibilidad por los herbívoros (Queiroz et al., 2008). En múltiples estudios se ha evidenciado el papel que presenta la enzima PPO en la defensa vegetal, siendo incrementada su expresión en presencia de diversos estreses bióticos y abióticos (Bhonwong et al., 2009).

4.2.2. Funciones de los compuestos fenólicos en plantas

La acumulación de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales de plantas sometidas a estrés sugiere una función de adaptación por parte de estos metabolitos que resulta clave para la supervivencia frente a condiciones adversas (Cheynier et al., 2013). Además, se sabe que los compuestos fenólicos están relacionados con funciones básicas como el crecimiento y la reproducción. En este sentido, la biosíntesis de compuestos fenólicos complejos como las ligninas resulta un proceso clave en el desarrollo vegetal (Bhattacharya et al., 2010), así como en la protección física frente a patógenos y herbívoros (War et al., 2012). Sin embargo, ciertos flavonoides como la quercetina y el kaempferol han sido relacionados con una inhibición del crecimiento, a través de una interrupción del transporte polar de las auxinas (Besseau et al., 2007; Brown et al., 2001). Otros flavonoides, como son las antocianinas, son responsables de la pigmentación en las flores y los frutos, resultando esenciales en la reproducción gracias a su capacidad de atraer polinizadores y otros animales que se encargan de dispersar las semillas (Samanta et al., 2011).

Generalmente, el papel de los compuestos fenólicos en la defensa vegetal está relacionado con sus propiedades antimicrobianas y disuasorias. En las plantas, estos compuestos suelen estar distribuidos en las células epidérmicas, en la capa de cera de las hojas o en exudados de las raíces (Lattanzio et al., 2006). Numerosos estudios han indicado que ciertos compuestos fenólicos presentan propiedades antifúngicas, como es el caso de la quercetina y la luteolina, entre otros flavonoides, en la defensa del olivo (*Olea europaea* L.) contra *Verticillium dahliae* Kleb. (Báidez et al., 2007). Otros estudios

han corroborado el efecto antifúngico de ciertos derivados del metabolismo de la quercetina, como la dihidroquercetina, que inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Skadhauge et al., 1997) o la quercetina 3-metil-éter y sus glucósidos 4' y 7, que disminuye la germinación de *Neurospora crassa* (Parvez et al., 2004). Los compuestos fenólicos también presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias gracias a su capacidad de interferir en la integridad estructural de las membranas bacterianas y la inhibición de enzimas implicadas en el transporte electrónico (Bhattacharya et al., 2010).

Los compuestos fenólicos en las plantas también desempeñan una función protectora frente a los insectos u otros animales. Por ejemplo, determinados cultivares de trigo ricos en compuestos fenólicos resultaron menos atractivos para el pulgón de los cereales (*Rhopalosiphum padi*) (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Además, los taninos tienen efectos negativos sobre el sistema digestivo de los insectos, actuando como toxinas capaces de unirse a proteínas salivares (Rehman et al., 2012). Otros compuestos fenólicos, como el ácido cinámico o el *p*-cumárico, resultaron ser relativamente tóxicos frente a los insectos *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera litura* (Dixit et al., 2017). Además de las funciones defensivas que presentan los compuestos fenólicos frente a los insectos, existen evidencias sobre el potente efecto que poseen estos compuestos contra los nemátodos (Ohri y Pannu, 2010).

En cierta medida, estas propiedades tóxicas o disuasorias de los compuestos fenólicos también pueden ser debidas a su metabolismo. La acción de la enzima PPO sobre los compuestos fenólicos produce su polimerización mediante uniones covalentes a proteínas, lo que conduce a una reacción necrótica en los tejidos vegetales. Esta reacción ocasiona una barrera impermeable que impide el desarrollo de los patógenos (Lattanzio et al., 2006). Además, la polimerización de las quinonas es capaz de inhibir la digestión de los herbívoros y causa una toxicidad directa sobre los insectos, reduciendo considerablemente el valor nutricional de la planta (War et al., 2012).

Los compuestos fenólicos también tienen un papel clave en la defensa de las plantas frente a estreses abióticos como la sequía (Hernández et al., 2004; Varela et al., 2016) o el exceso de radiación de luz ultravioleta B (UVB). En relación al estrés causado por la radiación UVB, cabe destacar que algunos de estos compuestos absorben luz en la región UVB (280-320 nm) del espectro solar (Ryan et al., 2001). Por ello, los compuestos fenólicos pueden tener un efecto protector de la epidermis, evitando daños celulares

causados por las alteraciones en el ADN o la inactivación de coenzimas NAD(P) debidas a un exceso de radiación UVB (Lattanzio et al., 2006). Además de su función protectora mediante la absorción de luz UVB, los compuestos fenólicos pueden reducir el estrés oxidativo mediante la neutralización de ROS generadas por este tipo de radiación (Neugart et al., 2016). Diversos estudios han evidenciado el papel fotoprotector de los compuestos fenólicos, como se ha observado en el trabajo realizado por Ryan et al. (2001), donde se comprobó que el contenido en flavonoides se incrementó en presencia de luz UVB en plantas de *A. thaliana*. Otros estudios llevados a cabo en kale (*B. oleracea* var. *acephala*) confirmaron que la biosíntesis de glicósidos de flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos es dependiente de la luz UVB y la temperatura. Dichos compuestos se incrementaron en el kale mediante un tratamiento con luz UVB y una temperatura de 15°C, en comparación con el tratamiento de 5°C (Neugart et al., 2014). Además, bajo esas condiciones, se observó un aumento en la expresión de los genes relacionados con la ruta biosintética de los compuestos fenilpropanoides (Neugart et al., 2016).

Por otro lado, ciertos flavonoides juegan un papel fundamental como moléculas señal en la simbiosis entre las plantas y los microorganismos (Taiz y Zeiger, 2010). Uno de los casos más conocidos es el de la familia de las leguminosas, las cuales liberan isoflavonas desde las raíces que actúan como señales para las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo. Las isoflavonas desencadenan una respuesta en estas bacterias que finaliza con la formación de los nódulos radiculares en la planta hospedadora, donde tiene lugar la simbiosis (Samanta et al., 2011). Sin embargo, los compuestos fenólicos también pueden actuar como fitoalexinas, incrementando las respuestas de defensa de las plantas frente al ataque de los patógenos, como es el caso de los estilbenoides (Jeandet, 2015).

La función de ciertos compuestos fenólicos como moléculas alelopáticas ha sido ampliamente estudiada. En este sentido, algunos compuestos fenilpropanoides simples liberados por las plantas en el suelo, como el ácido ferúlico, son capaces de inhibir el crecimiento y la germinación de otras plantas competidoras por los recursos nutricionales (Taiz y Zeiger, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que una serie de compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico, el ácido gálico, el ácido cafeico o el ácido *p*-hidroxibenzoico, producidos por la planta *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (Fabaceae) son capaces de inhibir el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y col china (*B. rapa* ssp. *chinensis*) (Li et al., 2010). Muchos compuestos fenólicos con efectos

alelopáticos y de defensa contra microorganismos se localizan también en las semillas de las plantas, siendo el caso de la quercetina en semillas del género *Trifolium* L. (Fabaceae) o de la rutina (diglucósido de la quercetina) en semillas del género *Brassica* (Samanta et al., 2011).

4.2.3. Papel fisiológico de los compuestos fenólicos en humanos

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos apoyan la evidencia de que el consumo de compuestos fenólicos disminuye el riesgo de padecer ciertas enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o los desórdenes metabólicos (Zhang y Tsao, 2016). Una de las principales características por las cuales los compuestos fenólicos presentan beneficios sobre la salud son sus propiedades antioxidantes contra los radicales libres que se generan en el organismo. Esta capacidad antioxidante depende principalmente de los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos de estos compuestos (Ozcan et al., 2014). En este sentido, los grupos hidroxilo del anillo B de los flavonoides es un factor determinante en la capacidad de estos compuestos para neutralizar radicales libres. Además, se ha sugerido que los flavonoles, que tienen un grupo hidroxilo en la posición 3, podrían presentar la mayor actividad antioxidante dentro de los flavonoides (Wang et al., 2006).

Otro mecanismo de actuación de los compuestos fenólicos frente al estrés oxidativo es la inducción de la expresión de genes que codifican enzimas de fase II, mediante la activación del factor transcripcional Nrf2 (Zhang y Tsao, 2016). En diferentes estudios *in vitro* se ha evidenciado este papel de los compuestos fenólicos en la activación de Nrf2, tanto en astrocitos (Erlank et al., 2011), como en células cancerosas de hígado (Saw et al., 2014). Además, los flavonoides también son capaces de activar el factor transcripcional Nrf2 en ensayos *in vivo*, donde se ha observado un posible efecto neuroprotector de estos compuestos en diferentes modelos animales (Leonardo y Doré, 2011). Estos estudios sugieren un papel protector de los compuestos fenólicos frente a daños cerebrales u otros problemas neurológicos. Además, los flavonoides tienen la capacidad de inhibir la progresión del ciclo celular mediante diferentes mecanismos y actúan disminuyendo la carcinogénesis y la angiogénesis *in vitro* (Fotsis et al., 1997; Jeong et al., 2009).

Gran parte de los flavonoides presentan propiedades antiinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*, actuando a través de diversos mecanismos sobre las células encargadas de la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2004) (Figura 11):

- Inhibición de la fosfolipasa A2 (FLA2). La enzima FLA2 es la encargada de la liberación del ácido araquidónico (precursor de los eicosanoides) desde las membranas celulares, siendo una mediadora crucial en el inicio de la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2004). Uno de los flavonoides que presenta una mayor actividad inhibidora de FLA2 es la quercetina (Cotrim et al., 2011).
- Inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y de la lipoxigenasa (LOX). Las enzimas COX y LOX juegan un papel clave como mediadores de la inflamación, siendo las responsables de la transformación del ácido araquidónico en los eicosanoides. Ciertos compuestos fenólicos han mostrado una inhibición de estas enzimas, como es el caso de la luteolina en la inhibición de la COX *in vivo* (Ziyan et al., 2007), o el caso de la quercetina y el kaempferol como inhibidores de ambas enzimas (García-Mediavilla et al., 2007).
- Producción de óxido nítrico (NO). El NO es uno de los mediadores en las respuestas fisiológicas y patológicas, siendo sintetizado a partir de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Entre las isoformas de esta enzima, cabe destacar la NOS inducible (iNOS), que es altamente expresada mediante los estímulos inflamatorios en células animales como los macrófagos (Kim et al., 2004). En un estudio llevado a cabo por Raso et al. (2001), se demostró que una flavona, la apigenina, y la quercetina actuaron como potentes inhibidores de la producción de NO en macrófagos y su acción fue dependiente de la dosis utilizada. Este efecto fue provocado por la inhibición de las enzimas iNOS y COX-2 por parte de dichos flavonoides.
- Interacción en las cascadas de señalización. Los efectos antiinflamatorios llevados a cabo por los flavonoides también pueden ser debidos a la inhibición de proteína kinasas implicadas en la transducción de señales, como la PKC o las MAPK. La inhibición de estas rutas de transducción de señales conduce a la modificación de la expresión de

genes relacionados con la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2004; Nijveldt et al., 2001).

- Inhibición de moléculas proinflamatorias. Se ha observado en modelos animales *in vivo* que la quercetina también es capaz de disminuir los marcadores proinflamatorios en sangre, como son las interleucinas IL-1 α e IL-4 o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Pan et al., 2010).

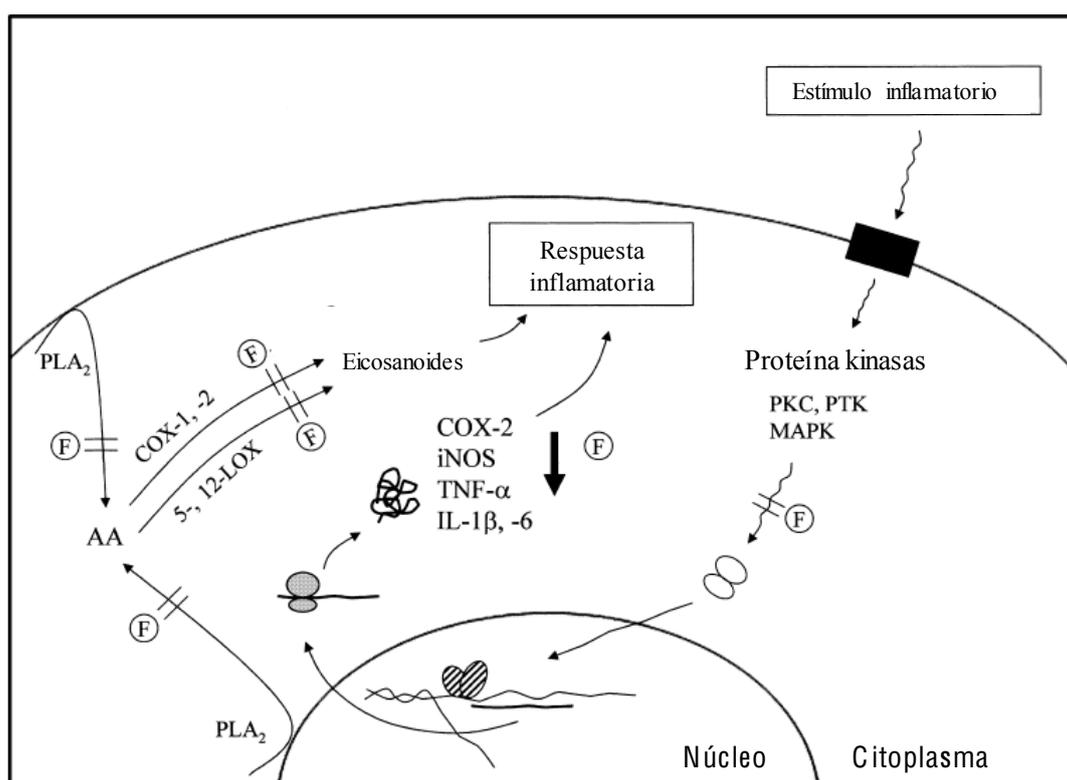


Figura 11. Mecanismo propuesto para el modelo de acción de los flavonoides (F) sobre la respuesta inflamatoria. Los flavonoides actúan a nivel de proteína quinasas como la proteína quinasa C (PKC), tirosina quinasas (PTK) o proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Los flavonoides también tienen un efecto sobre la producción de ácido araquidónico (AA) y eicosanoides, inhibiendo enzimas como la fosfolipasa A2 (PLA₂), las ciclooxigenasas (COX) y las lipoxigenasas (LOX). Finalmente, los flavonoides también pueden reducir la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de moléculas proinflamatorias como las interleucinas (IL), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o el óxido nítrico (NO) mediante la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Adaptado de Kim et al. (2004).

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los compuestos fenólicos se encuentran estrechamente relacionadas con sus efectos protectores frente a enfermedades

cardiovasculares. Debido a sus propiedades antioxidantes, se ha comprobado en diversos estudios *in vivo* o epidemiológicos que ciertos flavonoides son capaces de reducir la oxidación del LDL en sangre, lo cual daña los endotelios vasculares y promueve la formación de placas ateroscleróticas (Nijveldt et al., 2001; Pan et al., 2010). Además, existen claras evidencias de que los flavonoles ejercen un efecto vasodilatador sobre los endotelios, como es el caso de la quercetina y uno de sus derivados, la isoramnetina, que incluso mostraron un mayor efecto sobre arterias coronarias (Ibarra et al., 2002). Todas estas evidencias relacionadas con los flavonoides, junto a otros efectos como el antitrombogénico mediante la inhibición de la agregación plaquetaria (Nijveldt et al., 2001) o la reducción de la presión sanguínea, hacen que estos compuestos posean un importante efecto preventivo frente a las formas más comunes de enfermedades cardiovasculares (Perez-Vizcaino y Duarte, 2010).

5. Cultivo *in vitro* de plantas

El término “cultivo *in vitro*” de plantas hace referencia al cultivo en condiciones asépticas de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones físico-químicas definidas *in vitro* (Thorpe, 2007). La historia del cultivo de células y tejidos vegetales se remonta a más de un siglo, cuando Haberlandt consiguió aislar diferentes células de plantas que mantuvo con vida durante varias semanas en soluciones nutritivas. Microscópicamente, Haberlandt observó en estas células cambios morfológicos en las paredes celulares, los núcleos y los cloroplastos, aunque no consiguió evidenciar la división celular (Höxtermann, 2003). Fue en 1902 cuando Haberlandt presentó su hipótesis sobre la capacidad intrínseca de las células vegetales aisladas para mantener una vida autónoma (Fehér, 2019). Durante la década de 1930, esta hipótesis fue apoyada por Philip White, quien consiguió mantener raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en crecimiento sobre un medio de cultivo líquido durante un periodo de tiempo de un año (White, 1934).

Este hallazgo fue seguido por el descubrimiento del papel de las fitohormonas en la proliferación de las células vegetales *in vitro*. Además, se estableció que la proporción de estas hormonas determina la morfogénesis en el tejido cultivado *in vitro*: una proporción de citoquininas elevada en relación a auxinas favorece la caulogénesis (regeneración de tallos), mientras que una baja proporción de citoquininas en relación a auxinas favorece la rizogénesis (formación de raíces); sin embargo, una proporción

equilibrada de ambos tipos de fitohormonas induce el crecimiento de una masa celular (Skoog y Miller, 1957; Skoog y Tsui, 1948). Esta masa de células en proliferación fue llamada “callo”, debido a su parecido al tejido vegetal en reparación después de un daño mecánico.

A finales de la década de 1950, se comprobó que, además de regenerar tallos o raíces a partir de células vegetales cultivadas *in vitro*, se podían obtener plantas completas a partir de células mediante la formación de embriones (Steward, 1958). Posteriormente, este descubrimiento se denominó “embriogénesis somática” por Backs-Hüsemann y Reinert (1970) y constituye la confirmación de la hipótesis de la “totipotencia” inherente en la Teoría Celular de Schleiden y Schwann de 1839 (Vasil, 2008), así como de los experimentos realizados por Haberlandt (Fehér, 2019). Sin embargo, el término “totipotencia” no fue popularizado entre los botánicos hasta la década de 1950, según el cual cada célula vegetal, bajo las condiciones apropiadas, tiene el potencial de desarrollarse mediante regeneración en un organismo completo (Höxtermann, 2003).

Esta totipotencialidad de las células vegetales ha sido explotada mediante las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* (Thorpe, 1994). Entre estas técnicas destaca el cultivo de tejidos vegetales diferenciados, como la micropropagación de brotes o el cultivo de raíces pilosas (*hairy roots*), las cuales se obtienen mediante el co-cultivo de raíces y la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* y son capaces de crecer sin la aplicación de reguladores del crecimiento (Steingroewer et al., 2013). Otra técnica destacada dentro del cultivo *in vitro* de plantas supone la inducción de la dediferenciación de tejidos para obtener callos, los cuales constituyen una masa de células que crecen sobre un medio de cultivo sólido. A partir del cultivo de callos puede iniciarse el crecimiento de suspensiones celulares vegetales, mediante la transferencia de una porción de callo friable (fácilmente disgregable) en un medio de cultivo líquido, obteniéndose un crecimiento de células individuales o de pequeños agregados celulares (Malik et al., 2011).

El cultivo *in vitro* de plantas supone una herramienta importante, tanto en la investigación básica como aplicada, así como en diferentes aplicaciones comerciales (Thorpe, 2007). Las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas suponen una estrategia biotecnológica rentable para la obtención de metabolitos de interés, de alto valor añadido y con aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética o agro-alimentaria. Esto es posible debido a que las células de las plantas cultivadas *in vitro* también son totipotentes

desde el punto de vista biosintético, lo que implica que cada célula, bajo las condiciones adecuadas, es capaz de producir los mismos compuestos químicos que la planta de la cual procede (Yue et al., 2016). Existen numerosos estudios relacionados con la aplicabilidad del cultivo *in vitro* de plantas como biofactorías vegetales para la producción de metabolitos de interés, ya sea mediante el cultivo de órganos (Hussain et al., 2012; Karuppusamy, 2009; Skrzypczak-Pietraszek et al., 2014), raíces pilosas (Fattahi et al., 2013; Georgiev et al., 2007; Pitta-Alvarez y Giulietti, 1995) o suspensiones celulares (Ochoa-Villarreal et al., 2016).

Además, el cultivo *in vitro* de plantas presenta otras aplicaciones como es el uso de los cultivos celulares vegetales para producir proteínas recombinantes (Hellwig et al., 2004), la generación de haploides mediante técnicas como el cultivo de anteras (Mishra y Rao, 2016), así como la conservación de especies silvestres mediante la micropropagación (Fay, 1994) o la producción de semillas artificiales mediante la embriogénesis somática (Paunescu, 2009).

5.1. Técnicas de cultivo *in vitro* en brócoli

En general, las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen una excelente oportunidad para la mejora genética de las especies de importancia en la agricultura. El cultivo *in vitro* supone una gran ventaja a la hora de propagar más rápidamente aquellas plantas con características genotípicas de interés, obteniendo una gran cantidad de plantas idénticas o clones (Cao y Earle, 2003). En este sentido, existen muchos estudios donde se emplean estas técnicas en brócoli, incluyendo organogénesis directa o indirecta, embriogénesis somática y micropropagación (Kumar y Srivastava, 2016).

Aunque existen numerosos estudios en la década de 1970 que tratan sobre la regeneración *in vitro* de diferentes plantas del género *Brassica* mediante la organogénesis directa (ya sea a partir de explantos como hojas, anteras, raíces o protoplastos), no fue hasta la década de 1980 cuando Lazzeri y Dunwell publicaron sus resultados obtenidos de la regeneración *in vitro* de brócoli a partir de explantos de raíces (Lazzeri y Dunwell, 1984) y de otros tejidos obtenidos de plantas jóvenes (Lazzeri y Dunwell, 1986). Entre las conclusiones extraídas de estas investigaciones destaca que la tasa de regeneración aumentaba con la edad de la plántula y que los hipocótilos fueron los explantos con mayor capacidad de regeneración *in vitro*.

Otros estudios de regeneración *in vitro* fueron realizados mediante organogénesis indirecta, donde existe un paso intermedio en el que se produce el crecimiento de un callo, para después inducir su diferenciación en brotes. Los explantos de partida en estos estudios también pueden ser variables, desde protoplastos de hoja de brócoli (Robertson y Earle, 1986) hasta tejidos, siendo el hipocótilo el más utilizado (Kim y Botella, 2002). Cabe destacar que un gran número de estudios señalan que los explantos de hipocótilo ofrecen los mejores resultados en la regeneración de plantas de brócoli *in vitro*, lo cual podría ser debido a que este tejido es muy activo fisiológicamente y sus células presentan una pared menos rígida, pudiendo ser más fácilmente influenciado por factores exógenos como los reguladores del crecimiento (Kumar y Srivastava, 2016; Ravanfar et al., 2009).

La embriogénesis somática también puede ser utilizada para obtener un gran número de plantas, así como fuente de semillas artificiales (Thorpe, 1994). Esta técnica requiere la inducción de callos que, posteriormente, serán estimulados para desarrollar embriones somáticos. Existen numerosos estudios donde se ha aplicado la embriogénesis somática en brócoli, partiendo de granos de polen en estado de microsporas (Takahata y Keller, 1991), estigmas (Zenkter et al., 2006) u otros tejidos más utilizados como los cotiledones y los hipocótilos (Qin et al., 2007).

5.2. Suspensiones celulares vegetales como biofactorías para la producción de compuestos bioactivos

Debido a las múltiples propiedades que presentan los metabolitos secundarios de las plantas, así como por sus posibles aplicaciones en la industria, resulta interesante desarrollar estrategias para su obtención que sean alternativas al cultivo convencional, el cual presenta una serie de desventajas: se encuentra muy expuesto a factores ambientales bióticos y abióticos; muchos metabolitos secundarios son sintetizados en baja cantidad y en tejidos especializados, lo que puede complicar el proceso extractivo; y muchas especies de plantas, usadas para extraer fármacos u otros compuestos, no son cultivadas sino silvestres, lo que puede provocar su extinción (Steingroewer et al., 2013). La síntesis química de estos metabolitos de interés es una estrategia alternativa importante, especialmente para aquellas moléculas de estructura relativamente sencilla. Sin embargo, muchos compuestos bioactivos presentan estructuras complejas que están relacionadas con sus funciones, haciendo que su síntesis química resulte muy compleja o inviable (Ochoa-Villarreal et al., 2016).

La estrategia biotecnológica de producción de compuestos bioactivos mediante el uso de suspensiones celulares vegetales presenta una serie de ventajas frente al cultivo convencional:

- La producción es independiente de las condiciones climáticas y estacionales, siendo también ajena a contaminantes (Malik et al., 2011).
- Evita problemas ecológicos relacionados con la destrucción del medio ambiente o la explotación de especies en peligro de extinción (Matkowski, 2008).
- Las suspensiones celulares vegetales están libres de microorganismos y plagas, ya que se cultivan en condiciones de asepsia (Hussain et al., 2012).
- Presenta menores requerimientos de agua que el cultivo convencional (Ochoa-Villarreal et al., 2016).
- La obtención de los compuestos puede resultar más controlada, rápida y eficiente (Anand, 2010). Además, la posibilidad de secreción de los metabolitos de interés al exterior celular supone una gran ventaja a la hora de obtener estos compuestos, sin la necesidad de utilizar complejos procesos extractivos (Cai et al., 2012).
- Se pueden optimizar las condiciones de cultivo con el fin de incrementar la producción de compuestos de interés (Matkowski, 2008).

Uno de los parámetros que pueden ser optimizados con el fin de incrementar la producción de metabolitos secundarios es el crecimiento de las suspensiones celulares. Para ello, se puede realizar una curva de crecimiento midiendo una serie de parámetros como la densidad y viabilidad celular, el pH del medio de cultivo o el consumo de nutrientes por las células (Azevedo et al., 2008). Las curvas de crecimiento de las suspensiones celulares vegetales muestran tres fases típicas: una fase *lag* o de latencia, en la que las células se adaptan y preparan metabólicamente antes de comenzar el crecimiento; una fase exponencial del crecimiento, donde las células se dividen activamente; y finalmente, una fase estacionaria, donde la densidad celular permanece constante debido a que la velocidad de crecimiento se iguala a la muerte celular promovida por el agotamiento de nutrientes (Figura 12). Cabe destacar que, en algunos casos, puede producirse una cuarta fase de muerte celular donde la escasez total de nutrientes en el medio de cultivo y en las reservas intracelulares conduce a la disminución de la densidad celular (Zabala et al., 2010).

La caracterización de la curva de crecimiento en un cultivo celular vegetal puede ofrecer una serie de parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento exponencial (V_{exp}), que se corresponde con la pendiente de la fase exponencial del crecimiento, o el tiempo de agotamiento de nutrientes (T_a), que tiene lugar en la intersección de las rectas que delimitan la fase exponencial y la estacionaria, e indica el momento necesario para realizar el subcultivo de las suspensiones celulares (Figura 12). El análisis de la curva de crecimiento y sus parámetros cinéticos resulta de utilidad en la optimización de las condiciones de producción de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares y su posterior escalado a nivel industrial. Este análisis es importante ya que, en general, la producción de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares vegetales no está asociada al crecimiento. En la mayoría de los casos, la biosíntesis de los metabolitos secundarios tiene lugar cuando ocurre el cese de la multiplicación celular y la suspensión celular entra en la fase estacionaria (Taticek et al., 1991).

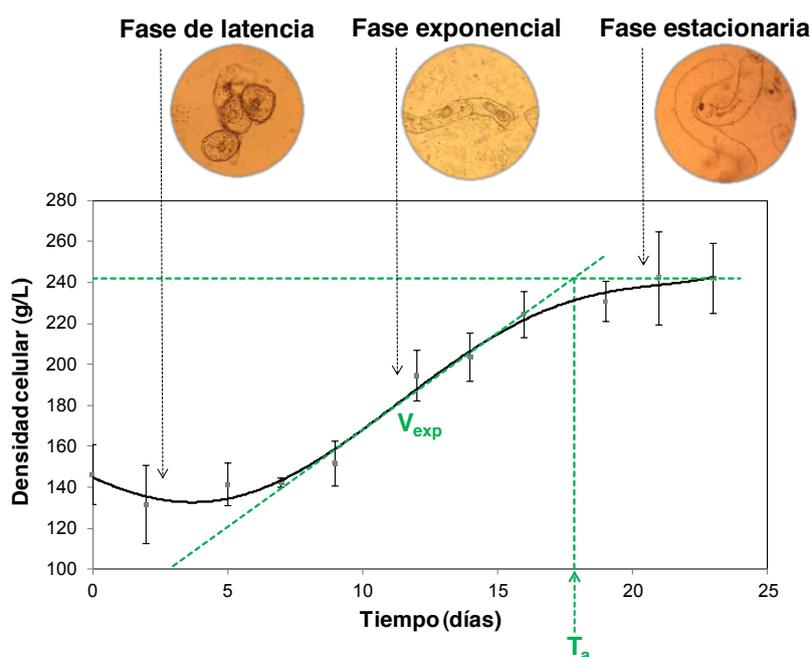


Figura 12. Ejemplo de curva de crecimiento de suspensiones celulares vegetales y morfología típica de las células en cada fase del crecimiento. Parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento exponencial (V_{exp}) y tiempo de agotamiento de nutrientes (T_a).

En la optimización de la producción de metabolitos secundarios mediante el uso de suspensiones celulares también es necesario tener en cuenta las condiciones de cultivo, ya que la biosíntesis de estos compuestos es fácilmente modificable por factores externos como las condiciones de luz, temperatura o los niveles de nutrientes y reguladores del

crecimiento (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002; Yue et al., 2016). En este sentido, un aumento en la concentración de sacarosa, que es un componente clave en los medios de cultivo actuando como fuente de carbono y energía para las células, es capaz de incrementar, en algunos casos, la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares vegetales. Al contrario que la sacarosa, una reducción de los macronutrientes en el medio de cultivo, especialmente de fosfatos, puede producir un aumento en la producción de metabolitos secundarios, seguido de una reducción del crecimiento celular. Además, los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo también juegan un papel clave en la inducción o inhibición de la producción de metabolitos secundarios, siendo sus efectos muy dependientes de la línea celular y el tipo de fitohormona (Matkowski, 2008; Taticek et al., 1991).

Entre las diferentes aproximaciones realizadas para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés en suspensiones celulares destaca la adición de precursores. Este método se basa en la utilización de cualquier compuesto que forme parte de la ruta biosintética del producto final, ya sea un precursor o un intermediario en dicha ruta. Sin embargo, el principal problema relacionado con esta estrategia es la posible toxicidad del precursor utilizado ya que, a ciertas concentraciones, podría inhibir el crecimiento o incluso provocar respuestas indeseadas en las células vegetales (Yue et al., 2016). Entre los compuestos utilizados para incrementar la producción de metabolitos secundarios en suspensiones vegetales destacan los precursores aminoacídicos, como puede ser el uso de la fenilalanina para estimular la producción de compuestos fenólicos u otros metabolitos secundarios que dependen de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides (Matkowski, 2008; Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002; Skrzypczak-Pietraszek et al., 2014).

Finalmente, como una de las estrategias más efectivas en la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés en cultivos celulares vegetales destaca la elicitación (Cusido et al., 2014). La elicitación consiste en la adición de elicitores, los cuales son moléculas que desencadenan una situación de estrés en el cultivo celular, induciendo como resultado la acumulación de metabolitos secundarios (Vasconsuelo y Boland, 2007; Zabala et al., 2010). La exposición a factores de estrés como los elicitores también está asociada con una excesiva producción de ROS y un desequilibrio del estado redox, así como con la síntesis de proteínas PR (Belchí-Navarro et al., 2019; Bru et al., 2006; Matkowski, 2008; Sabater-Jara et al., 2014a).

En general, los elicitores se utilizan a bajas concentraciones y, dependiendo de su naturaleza, pueden ser clasificados en bióticos o abióticos (Malik et al., 2011). Los elicitores abióticos son considerados sustancias que no tienen un origen biológico, siendo principalmente compuestos inorgánicos como sales o iones metálicos (Ramirez-Estrada et al., 2016) y factores físicos como la luz ultravioleta o los cambios de temperatura (Yue et al., 2016). Por otro lado, los elicitores bióticos, que tienen un origen biológico, pueden ser derivados de un patógeno (como la quitina o el quitosán) o de la misma planta (como ciertas moléculas señal). Estos elicitores bióticos pueden tener una composición definida, cuando sus estructuras moleculares son conocidas, o presentar una composición compleja, como es el caso del extracto de levadura o las esporas de hongos (Vasconsuelo y Boland, 2007).

5.2.1. Elicitación de suspensiones celulares con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón y compuestos por unidades de D-glucopiranosas conectadas mediante enlaces glucosídicos α -1,4. Según las unidades de D-glucopiranosas que contengan (6, 7 u 8), las ciclodextrinas se clasifican en α -, β - o γ -ciclodextrinas, respectivamente (Figura 13) (Tang et al., 2018). Las ciclodextrinas son solubles en agua y, a su vez, presentan una cavidad central hidrofóbica que les permite formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos. Dependiendo del tamaño de la ciclodextrina y de la molécula que alberguen, estos complejos pueden ser de tipo 1:1, 1:2 o 2:1 (molécula:ciclodextrina). Por ello, las ciclodextrinas presentan un gran número de aplicaciones en la química supramolecular y la nanotecnología (Freitag y Galoppini, 2011).

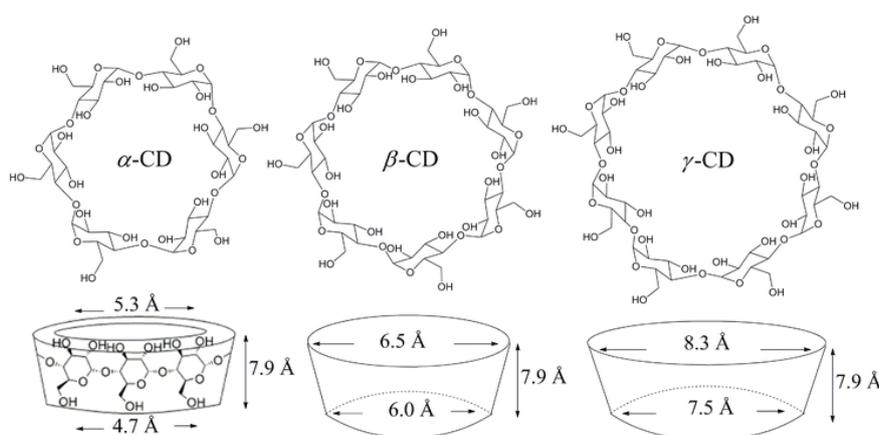


Figura 13. Estructura química y arquitectura de los tres tipos principales de ciclodextrinas (CD): α -, β - o γ -CD (Freitag y Galoppini, 2011).

El efecto elicitor de las ciclodextrinas puede ser debido a su semejanza química a los oligosacáridos pécticos alquil-derivados que se liberan de forma natural de las paredes celulares vegetales durante un ataque fúngico y que inducen la activación de una serie de eventos celulares que conducen a la biosíntesis de metabolitos secundarios de tipo fitoalexina (Bru et al., 2006). Además, la capacidad de formar complejos de inclusión con los metabolitos secundarios hace que éstos dejen de ser perceptibles por las células vegetales, disminuyendo, por tanto, la posible toxicidad de estos compuestos y reduciendo la inhibición por mecanismos de retroalimentación (*feedback*) (Belchí-Navarro et al., 2012). Cabe destacar que la alta acumulación de metabolitos de interés en el medio de cultivo debido a la acción de las ciclodextrinas supone una gran ventaja a la hora de extraer dichos metabolitos directamente desde el medio de cultivo (Cai et al., 2012; Miras-Moreno et al., 2016).

En numerosos estudios se ha evidenciado el papel de las ciclodextrinas como moléculas elicitoras, incrementando la producción de compuestos bioactivos de interés en diferentes cultivos celulares. Estos metabolitos producidos por la acción de las ciclodextrinas son de diferente naturaleza y presentan diversas aplicaciones, destacando compuestos como el taxol (Ramirez-Estrada et al., 2015; Sabater-Jara et al., 2014b), los tocoferoles (Almagro et al., 2016), diferentes ácidos grasos (Sánchez-Pujante et al., 2017), isoprenoides como los fitoesteroles (Briceño et al., 2012; Miras-Moreno et al., 2016; Sabater-Jara y Pedreño, 2013) y los carotenoides (Rizzello et al., 2014; Sánchez-Pujante et al., 2017), así como compuestos fenólicos como el *trans*-resveratrol y sus análogos (Belchí-Navarro et al., 2012; Martínez-Márquez et al., 2016) o la silimarina (Belchí-Navarro et al., 2011) y otros compuestos como la antraquinona (Perassolo et al., 2016).

5.2.2. Elicitación de suspensiones celulares con jasmonato de metilo

Los jasmonatos son moléculas señal que pueden actuar de forma local o sistémica en las plantas y regulan una serie de procesos como el desarrollo floral, la maduración del polen o la senescencia (Jung et al., 2007). Entre los jasmonatos destaca el ácido jasmónico y su derivado más activo, el jasmonato de metilo, los cuales han sido propuestos como componentes clave en la vía de transducción de señales implicadas en las reacciones de defensa de las plantas, que conllevan respuestas como la inducción de la biosíntesis de

metabolitos secundarios y la expresión de proteínas PR como las POX o los inhibidores de proteasas (Briceño et al., 2012; Farmer y Ryan, 1992; Gundlach et al., 1992).

Inicialmente, el jasmonato de metilo fue descubierto a partir del aceite esencial de jazmín en 1962. Durante la década de 1980, se evidenció la amplia distribución de esta molécula señal por todo el reino vegetal, así como su papel como inhibidor del crecimiento y promotor de la senescencia (Schaller et al., 2004). La biosíntesis de los jasmonatos en plantas tiene su origen a partir de la ruta de los octadecanoides, la cual tiene lugar entre los cloroplastos, los peroxisomas y el citoplasma (Figura 14). Cuando un estímulo activa las fosfolipasas, éstas liberan el ácido α -linolénico, presente en las membranas lipídicas de los cloroplastos. Este ácido α -linolénico es oxigenado por una LOX para formar el ácido 13-hidroxi-peroxilinolénico (13-HPOT), que después es convertido en ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) por la enzima aleno óxido sintasa (AOS) y la aleno óxido ciclasa (AOC) (Schaller y Stintzi, 2009). Se cree que el OPDA es transportado a los peroxisomas donde tiene lugar una reducción llevada a cabo por la OPDA reductasa, seguido de tres pasos de β -oxidación para sintetizar el ácido jasmónico. Finalmente, el ácido jasmónico puede ser metilado y transformado en jasmonato de metilo mediante la acción de la ácido jasmónico carboxil metiltransferasa (JMT), que es una enzima localizada en el citoplasma (Cheong y Choi, 2003).

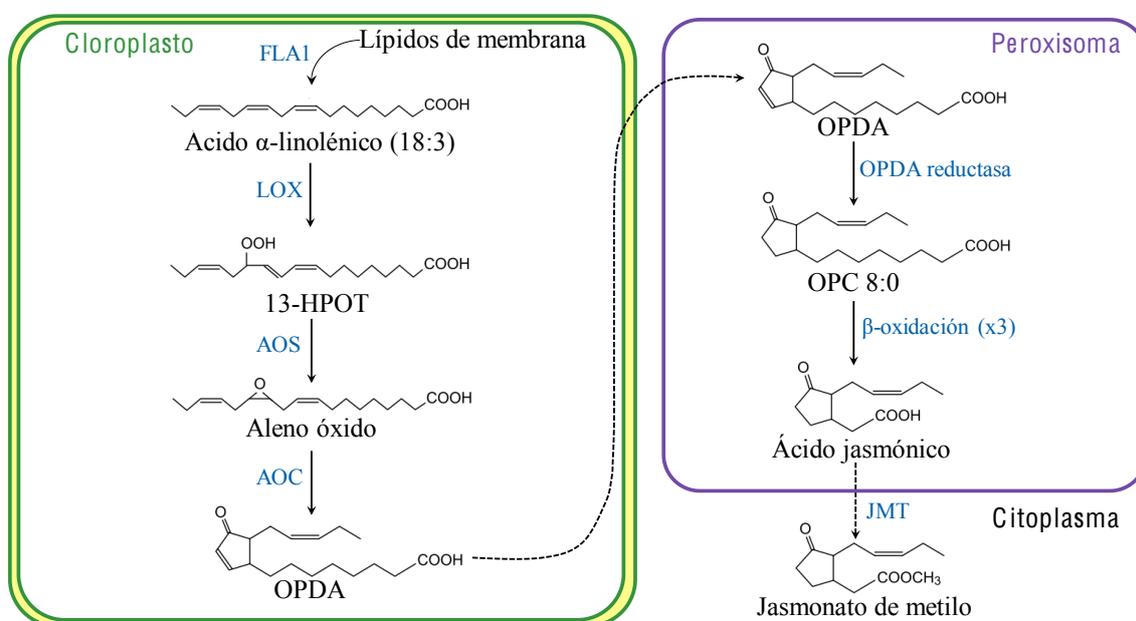


Figura 14. Ruta biosintética de los jasmonatos. Intermediarios de la ruta: 13-HPOT, ácido 13-hidroxi-peroxilinolénico; Aleno óxido, ácido 12,13-epoxi-9,11,15-octadecatrienoico; OPDA, ácido 12-oxo-fitodienoico; OPC 8:0, ácido 3-oxo-2(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico.

Enzimas en color azul: FLA1, fosfolipasa A1; LOX, lipooxigenasa; AOS, aleno óxido sintasa; AOC, aleno óxido ciclasa; JMT, ácido jasmónico carboxil metiltransferasa. Adaptado de Cheong y Choi (2003) y Schaller et al. (2004).

La naturaleza volátil del jasmonato de metilo hace posible su papel como molécula señal en las respuestas vegetales, las interacciones planta-herbívoro y las interacciones entre diferentes plantas (Cheong y Choi, 2003). Entre las respuestas que desencadena el jasmonato de metilo destacan la sobreexpresión de genes relacionados con la defensa, el estrés oxidativo, la modificación de la pared celular y la senescencia (Jung et al., 2007). Por otro lado, esta molécula señal tiene un efecto inhibitorio de la expresión de genes implicados en la síntesis de clorofila y la fotosíntesis (Tsuchiya et al., 1999). Además, cabe destacar el papel del jasmonato de metilo sobre determinadas fitohormonas, como es el caso de su efecto antagonista contra las respuestas producidas por el ácido abscísico (Jung et al., 2007) o su efecto sinérgico junto al etileno sobre las respuestas de defensa (Xu et al., 1994).

Por todo ello, el jasmonato de metilo ha sido ampliamente utilizado como elicitador con el fin de incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios. En cultivos celulares, el jasmonato de metilo se ha empleado como inductor de la biosíntesis de centelósidos (Bonfill et al., 2011), ginsenósidos (Ali et al., 2006), alcaloides como la ajmalicina (Lee-Parsons et al., 2004) y proteínas PR (Sabater-Jara et al., 2011). Cabe destacar que el jasmonato de metilo ha sido ampliamente utilizado en combinación con otros elicitores, particularmente ciclodextrinas, incrementando la biosíntesis de compuestos bioactivos en suspensiones celulares vegetales (Belchí-Navarro et al., 2012, 2011), observándose incluso un efecto sinérgico en la producción de *trans*-resveratrol (Lijavetzky et al., 2008), antraquinonas (Perassolo et al., 2016), alcaloides indólicos (Almagro et al., 2014) o taxanos (Sabater-Jara et al., 2014b) derivado del uso conjunto de ambos elicitores. Además, el jasmonato de metilo también ha sido utilizado como inductor de la biosíntesis de glucosinatos indólicos en plantas de *A. thaliana* (Wiesner et al., 2014).

5.2.3. Elicitación de suspensiones celulares con coronatina

La coronatina es una toxina producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*, que actúa como un análogo funcional y estructural de un derivado del ácido jasmónico producido por la conjugación de éste y el aminoácido isoleucina (Fonseca

et al., 2009). De hecho, la coronatina es aproximadamente 1.000 veces más activa que el conjugado entre el ácido jasmónico y la isoleucina *in vitro* (Katsir et al., 2008). Esto puede ser debido a que la coronatina presenta una estructura fija que imita la configuración en *cis* del ácido jasmónico unido al aminoácido [(+)-7-*iso*-JA-L-Ile], mientras que éste puede encontrarse en posición *trans* en condiciones fisiológicas, produciendo un conjugado con la isoleucina que resulta ser inactivo [(-)-JA-L-Ile] (Nakamura et al., 2014) (Figura 15).

Diversos estudios han demostrado que la coronatina actúa sobre las plantas mediante la activación de la ruta de señalización mediada por el ácido jasmónico, inhibiendo la elongación radicular, produciendo hipertrofia y clorosis, provocando la emisión de etileno e induciendo la acumulación de metabolitos secundarios y proteínas como los inhibidores de proteasas (Onrubia et al., 2013).

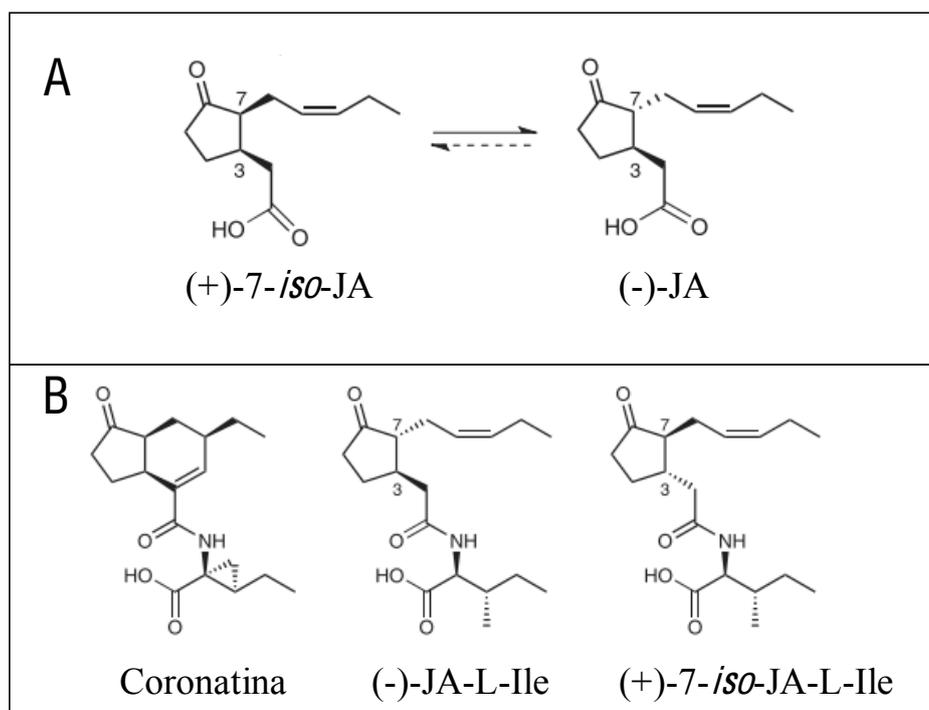


Figura 15. A. Epímeros del ácido jasmónico: forma activa en *cis* [(+)-7-*iso*-JA] y forma inactiva en *trans* [(-)-JA]. B. Estructura química de la coronatina y los conjugados entre las diferentes formas del ácido jasmónico y la L-isoleucina. Adaptado de Fonseca et al. (2009).

Weiler et al. (1994) fueron los primeros autores que utilizaron la coronatina como elicitador y observaron un incremento en la acumulación de metabolitos secundarios relacionados con la defensa en varios cultivos celulares vegetales. Aunque la coronatina ha sido menos utilizada como elicitador que el jasmonato de metilo, se ha demostrado que

determinados cultivos celulares vegetales tratados con coronatina producen más metabolitos secundarios que cuando son tratados con jasmonato de metilo, incluso a mayor concentración de elicitor y bajo las mismas condiciones de cultivo (Ramirez-Estrada et al., 2016).

La coronatina ha sido capaz de incrementar la producción de metabolitos secundarios como el taxol (Onrubia et al., 2013) o los fitoesteroles y ciertos compuestos fenólicos (Kim et al., 2017) en diferentes cultivos celulares vegetales. Además, también se ha observado un efecto sinérgico derivado del uso de la coronatina en combinación con las ciclodextrinas incrementando la biosíntesis de *trans*-resveratrol (Almagro et al., 2015) y taxol (Ramirez-Estrada et al., 2015) en cultivos celulares de vid (*Vitis vinifera* L.) y tejo (*Taxus × media* Rehder), respectivamente. En otros estudios, la coronatina también ha sido utilizada con el fin de aliviar los síntomas producidos por determinados estreses abióticos como la sequía o la salinidad, incrementando el metabolismo antioxidante en diferentes plantas como el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Xie et al., 2008), el arroz (*Oryza sativa* L.) (Ai et al., 2008) o la coliflor (Wu et al., 2012).

5.2.1. Elicitación de suspensiones celulares con cloruro sódico

La inducción de estrés fisiológico en cultivos celulares vegetales es una estrategia a tener en cuenta cuando se trata de incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios (Matkowski, 2008; Taticek et al., 1991). Entre los efectos provocados por el estrés salino en las plantas destaca el aumento de la actividad de las enzimas del metabolismo antioxidante (Ahmad et al., 2010). En este sentido, se ha demostrado que el estrés salino provocado por el tratamiento con cloruro sódico es capaz de incrementar la biosíntesis de alcaloides en diferentes cultivos celulares vegetales (Anitha y Ranjitha Kumari, 2006; Bhat et al., 2008). Aunque el brócoli es conocido por ser moderadamente tolerante al estrés salino, se ha demostrado que el tratamiento con cloruro sódico induce un incremento en los niveles de glucosinolatos, tanto en plantas de brócoli como en otras brasicáceas (López-Berenguer et al., 2008; Martínez-Ballesta et al., 2013).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue la utilización de suspensiones celulares de brócoli elicidadas para producir compuestos bioactivos, así como analizar el efecto que desencadenan los elicitores sobre las células de brócoli. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la biosíntesis y regulación de los glucosinolatos, así como su implicación en los mecanismos de defensa vegetal.
2. Describir las diferentes estrategias biotecnológicas llevadas a cabo para incrementar la producción de glucosinolatos en cultivos vegetales *in vitro*.
3. Establecer las suspensiones celulares de brócoli y caracterizar su crecimiento.
4. Caracterizar la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli bajo diferentes condiciones de elicitación.
5. Analizar los niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de los glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas.
6. Estudiar el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas.
7. Evaluar la producción de compuestos fenólicos y la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo en suspensiones celulares de brócoli elicidadas.
8. Analizar el efecto de los elicitores sobre el estado oxidativo de las células de brócoli mediante medidas de actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo antioxidante, el contenido en glutatión y los niveles de peroxidación de lípidos.
9. Identificar proteínas relacionadas con la defensa vegetal en las suspensiones celulares de brócoli elicidadas.

PUBLICACIONES

En base a los antecedentes descritos y los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, se han publicado un total de tres artículos en revistas científicas indexadas en bases de datos internacionales de reconocido prestigio:

1. P. J. Sánchez-Pujante, M. Borja-Martínez, M. A. Pedreño y L. Almagro (2017). “**Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures**”. *Planta*, 246(1), 19-32.

En este artículo se llevaron a cabo los dos primeros objetivos propuestos. Debido a la importancia que presentan los glucosinolatos como compuestos bioactivos del brócoli, se realizó una profunda búsqueda bibliográfica sobre su biosíntesis, su regulación y sus funciones en las plantas. Además, se describieron los diferentes sistemas de producción de estos compuestos basados en el uso de diferentes estrategias biotecnológicas, como son las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas. Contribución del doctorando: redacción y revisión crítica del manuscrito; conceptualización y preparación de las figuras y tablas.

2. P. J. Sánchez-Pujante, A. B. Sabater-Jara, S. Belchí-Navarro, M. A. Pedreño y L. Almagro (2018). “**Increased glucosinolate production in *Brassica oleracea* var. *italica* cell cultures due to coronatine activated genes involved in glucosinolate biosynthesis**”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(1), 102-111.

Debido a las múltiples ventajas derivadas del uso de las suspensiones celulares vegetales, se utilizó este sistema para producir compuestos bioactivos de brócoli. En este sentido, se han logrado establecer suspensiones celulares de brócoli y mantener su crecimiento de forma prolongada. En primer lugar, se utilizó la elicitación como técnica para incrementar la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli. Una vez establecido cuál fue el elicitador que incrementó en mayor medida estos compuestos, se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de los glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli elicitadas. Finalmente, se realizaron experimentos de elicitación modificando

diferentes condiciones de cultivo, con el fin de determinar cuáles fueron las condiciones óptimas de producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli.

Contribución del doctorando: realización de los experimentos necesarios para el desarrollo del trabajo; extracción y análisis de los compuestos bioactivos; análisis de la expresión génica; elaboración de las figuras y tablas; redacción y revisión crítica del manuscrito.

3. P. J. Sánchez-Pujante, M. Gionfriddo, A. B. Sabater-Jara, L. Almagro, M. A. Pedreño y P. Díaz-Vivancos (2020). “**Enhanced bioactive compound production in broccoli cells due to coronatine and methyl jasmonate is linked to antioxidative metabolism**”. *Journal of Plant Physiology*, 248, 153136.

En primer lugar, por la importancia de los compuestos fenólicos en brócoli, se evaluó la producción de estos metabolitos y se midió la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo en las suspensiones celulares de brócoli elicidadas. Una vez establecidas las condiciones de elicitación, se analizó el efecto de los elicitores sobre el nivel de estrés oxidativo causado en las suspensiones celulares de brócoli. Para ello, se midió la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo antioxidante, así como el contenido en glutatión y los niveles de la peroxidación de lípidos en las suspensiones celulares de brócoli elicidadas. Finalmente, se identificaron aquellas proteínas de las células de brócoli que se expresaban diferencialmente bajo condiciones de elicitación.

Contribución del doctorando: realización de los experimentos necesarios para el desarrollo del trabajo; extracción y análisis de compuestos bioactivos y proteínas; realización de las medidas de la actividad antioxidante; elaboración de las figuras y tablas; redacción y revisión crítica del manuscrito.

1. Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures

Pedro Joaquín Sánchez Pujante, María Borja Martínez, María Ángeles Pedreño y Lorena Almagro

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, España

Revista: Planta

Publicado: 10-05-2017

DOI: 10.1007/s00425-017-2705-9

Abstract: Glucosinolates are a class of secondary metabolites found mainly in Brassicaceae, which contain nitrogen and sulfur in their structures. Glucosinolates are divided into three groups depending on the amino acid from which they are biosynthesized. Aliphatic glucosinolates are generally derived from leucine, valine, methionine, isoleucine and alanine while indole and aromatic glucosinolates are derived from tryptophan and phenylalanine or tyrosine, respectively. These compounds are hydrolyzed by the enzyme myrosinase when plants are stressed by biotic and abiotic factors, obtaining different degradation products. Glucosinolates and their hydrolysis products play an important role in plant defense responses against different types of stresses. In addition, these compounds have beneficial effect on human health because they are strong antioxidants and they have potent cardiovascular, antidiabetic, antimicrobial and antitumoral activities. Due to all the properties described above, the demand for glucosinolates and their hydrolysis products has enormously increased, and therefore, new strategies that allow the production of these compounds to be improved are needed. The use of plant *in vitro* cultures is emerging as a biotechnological strategy to obtain glucosinolates and their derivatives. This work is focused on the biosynthesis of glucosinolates and the bioactivity of these compounds in plants. In addition, a detailed study on the strategies used to increase the production of several glucosinolates, in particular those synthesized in Brassicaceae, using *in vitro* plant cultures has been made. Special attention has been paid for increasing the production of glucosinolates and their derivatives using metabolic engineering.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-017-2705-9>

2. Increased glucosinolate production in *Brassica oleracea* var. *italica* cell cultures due to coronatine activated genes involved in glucosinolate biosynthesis

Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Ana Belén Sabater Jara, Sarai Belchí Navarro, María Ángeles Pedreño y Lorena Almagro

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, España

Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publicado: 19-12-2018

DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04298

Abstract: In this work, the effect of different elicitors and culture conditions on the production of glucosinolates in broccoli cell cultures was studied. The results showed that 0.5 μ M coronatine was the best elicitor for increasing glucosinolate production (205-fold increase over untreated cells after 72 h of treatment). Furthermore, the expression levels of some genes related to the biosynthetic pathway of glucosinolates as well as three Myb transcription factors also have been studied. The highest glucosinolate levels found in coronatine-treated cells were closely correlated with the highest gene expression levels of *Cyp79b2*, *Cyp83b1*, *St5a*, *Myb51*, and *Myb122* after 6 h of treatment. The data shown in this study provide new insight into the key metabolic steps involved in the biosynthesis of glucosinolates, which will be of use for future applications of metabolic engineering techniques in broccoli.

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.8b04298>

3. Enhanced bioactive compound production in broccoli cells due to coronatine and methyl jasmonate is linked to antioxidative metabolism

Pedro Joaquín Sánchez Pujante¹, Matteo Gionfriddo², Ana Belén Sabater Jara¹, Lorena Almagro¹, María Ángeles Pedreño¹ y Pedro Díaz Vivancos¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, España

²Department of Medicine, Unit of Food Science and Human Nutrition, Campus Bio-Medico University of Rome, via Álvaro del Portillo 21, 00128, Rome, Italy

Revista: Journal of Plant Physiology

Publicado: 22-02-2020

DOI: 10.1016/j.jplph.2020.153136

Abstract: Elicited broccoli suspension-cultured cells (SCC) provide a useful system for obtaining bioactive compounds, including glucosinolates (GS) and phenolic compounds (PCs). In this work, coronatine (Cor) and methyl jasmonate (MJ) were used to increase the bioactive compound production in broccoli SCC. Although the use of Cor and MJ in secondary metabolite production has already been described, information concerning how elicitors affect cell metabolism is scarce. It has been suggested that Cor and MJ trigger defence reactions affecting the antioxidative metabolism. In the current study, the concentration of 0.5 μ M Cor was the most effective treatment for increasing both the total antioxidant capacity (measured as ferulic acid equivalents) and glucosinolate content in broccoli SCC. The elicited broccoli SCC also showed higher polyphenol oxidase activity than the control cells. Elicitation altered the antioxidative metabolism of broccoli SCC, which displayed biochemical changes in antioxidant enzymes, a decrease in the glutathione redox state and an increase in lipid peroxidation levels. Furthermore, we studied the effect of elicitation on the protein profile and observed an induction of defence-related proteins. All of these findings suggest that elicitation not only increases bioactive compound production, but it also leads to mild oxidative stress in broccoli SCC that could be an important factor triggering the production of these compounds.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161720300249>

ANEXO: RESULTADOS NO PUBLICADOS

1. Estudio del efecto de la adición de precursores biosintéticos sobre la producción de glucosinolatos

La adición de precursores supone una estrategia muy común que tiene como fin incrementar la producción de un metabolito de interés. Este método está basado en la teoría de que cualquier compuesto que forme parte de una ruta biosintética supone una buena oportunidad para inducir la acumulación del producto final de dicha ruta (Yue et al., 2016). En diversos estudios se ha utilizado la adición, tanto de precursores aminoacídicos como de otros intermediarios de la ruta, con el fin de incrementar la biosíntesis de glucosinolatos (Gijzen et al., 1994; Songsak y Lockwood, 2004; Wielanek y Urbanek, 1999). Además, puede resultar ventajosa la omisión de ciertas rutas metabólicas para redirigir la utilización de estos precursores hacia la ruta biosintética deseada (Matkowski, 2008). En este sentido, se ha observado que la inhibición de la enzima PAL combinada con la adición de precursores aminoacídicos, resultó en la redirección de estos aminoácidos hacia la producción del glucosinolato aromático glucotropaeolina en cultivos de raíces pilosas de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) (Wielanek y Urbanek, 2006).

1.1. Efecto de la adición de hidrolizado de caseína sobre la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas

El hidrolizado de caseína es una mezcla de aminoácidos y péptidos producida mediante hidrólisis ácida o enzimática de la caseína (Kumar et al., 2018). Debido a que los glucosinolatos se biosintetizan a partir de aminoácidos (Halkier y Gershenzon, 2006), resulta interesante comprobar si las modificaciones en la concentración de hidrolizado de caseína (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en el medio de cultivo induce un incremento en la acumulación de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli. Para ello, se realizó un experimento de elicitación bajo condiciones de producción óptimas en suspensiones celulares de brócoli de 100 g/L de densidad celular en las que se añadió 0,5 µM de coronatina y diferentes concentraciones de hidrolizado de caseína (100, 250, 500, 750 mg/L y 1 g/L) en el medio de cultivo durante 72 horas (Figura 1).

Los resultados mostraron que la producción de glucosinolatos se vio afectada por el tratamiento de elicitación con coronatina y por la cantidad de hidrolizado de caseína añadida en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de brócoli. Sin embargo, la producción de glucosinolatos resultó inversamente proporcional a la concentración de hidrolizado de caseína en el medio de cultivo, siendo más elevada en presencia de concentraciones bajas (100 mg/L) de hidrolizado de caseína y no mostrando diferencias significativas con respecto a la adición de 250 mg/L de hidrolizado de caseína, la cual es la concentración utilizada de forma habitual para crecer las suspensiones celulares de brócoli. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Rubin et al. (2018), quienes observaron una disminución de los niveles de gluconasturtina y glucotropaeolina en plantas *in vitro* de *Nasturtium officinale* W.T. Aiton (Brassicaceae) conforme se incrementaba la concentración de hidrolizado de caseína en el medio de cultivo (desde 0,5 hasta 2 g/L). Estos resultados sugieren que concentraciones bajas de hidrolizado de caseína, y por tanto de aminoácidos, en el medio de cultivo son suficientes para incrementar la producción de glucosinolatos.

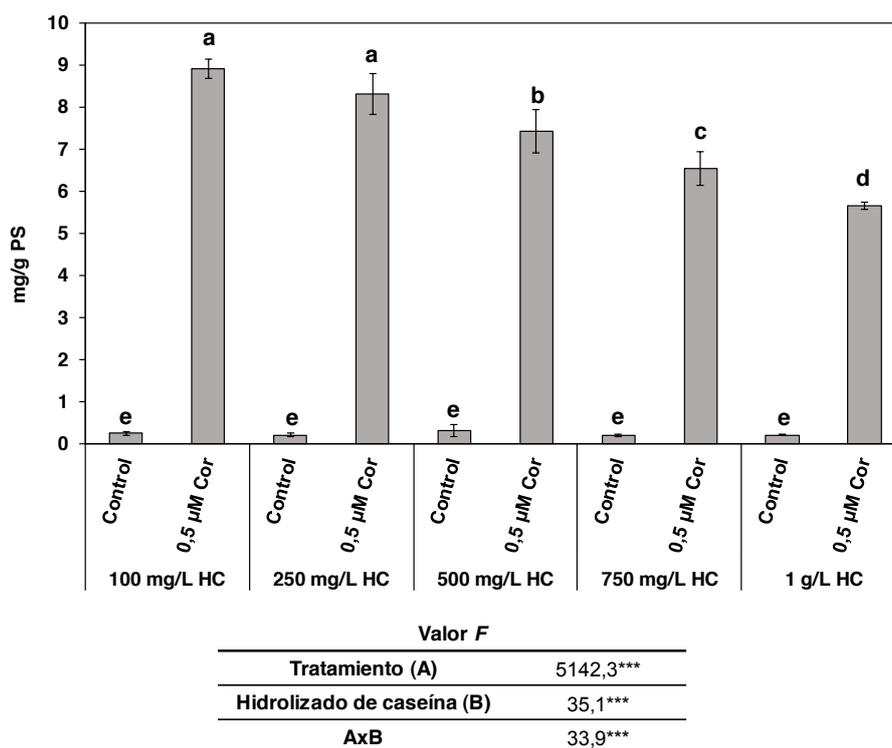


Figura 1. Producción de glucosinolatos totales expresada en mg/g de peso seco (PS) en suspensiones celulares de brócoli cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de hidrolizado de caseína (HC) y elicidadas con coronatina (Cor) durante 72 horas. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento, según el test de Tukey para $p \leq 0,05$. Los valores F del test ANOVA de dos colas son significativos al nivel de probabilidad del 99,9 % (***) , 99 % (**) o 95 % (*).

Por otro lado, paralelamente al experimento de elicitación, se realizó la medida de la viabilidad celular con el fin de determinar si existe un posible efecto perjudicial debido al exceso de aminoácidos en el medio de cultivo (Figura 2). Mientras que el tratamiento con coronatina no provocó un efecto significativo en la viabilidad celular, la adición de hidrolizado de caseína sí tuvo un efecto significativo en la viabilidad de las suspensiones celulares de brócoli. De hecho, se observó una disminución de la viabilidad celular relacionada con el aumento en la concentración de hidrolizado de caseína, alcanzando un mínimo del 60 % de viabilidad en las suspensiones celulares de brócoli cultivadas en un medio que contenía 1 g/L de hidrolizado de caseína. Este incremento en la muerte celular podría estar asociado a un efecto tóxico provocado por la alta concentración de aminoácidos en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de brócoli. La posible toxicidad de los precursores es un factor a tener en cuenta cuando se trata de incrementar la producción de metabolitos secundarios, ya que, a ciertos niveles, los precursores pueden disminuir el crecimiento de las células vegetales o incluso inhibir el metabolismo secundario por un mecanismo de *feedback* (Yue et al., 2016).

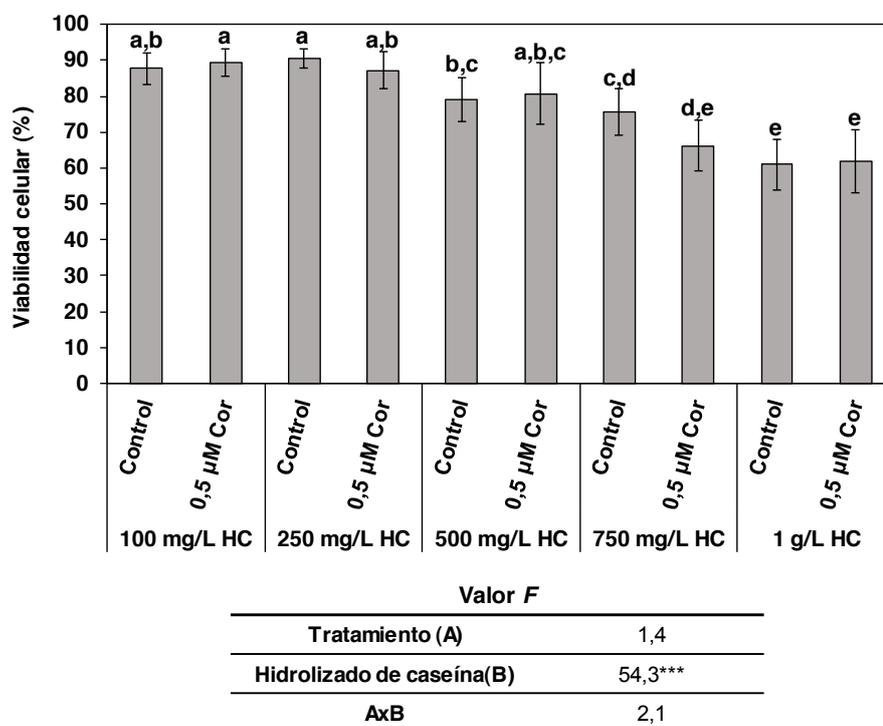


Figura 2. Viabilidad celular en suspensiones celulares de brócoli cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de hidrolizado de caseína (HC) y elicidadas con coronatina (Cor) a las 48 horas de tratamiento. La viabilidad celular fue medida utilizando yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína como marcadores en un microscopio óptico equipado con filtros de fluorescencia (Duncan y Widholm, 1990). Los valores representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento, según el test de Tukey para $p \leq 0,05$. Los valores F del test ANOVA de dos colas son significativos al nivel de probabilidad del 99,9 % (***) , 99 % (**) o 95 % (*).

1.2. Efecto de la adición de triptófano sobre la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli elicidadas

El triptófano es el precursor de la biosíntesis de los glucosinolatos indólicos y cualquier alteración en el metabolismo de este aminoácido puede resultar clave en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios (Chavadej et al., 1994). Debido a la elevada acumulación de glucosinolatos indólicos provocada por la presencia de coronatina en las suspensiones celulares de brócoli, se realizó un experimento de elicitación en el que se añadió triptófano (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a diferentes concentraciones: 100, 200 y 500 mg/L. Este experimento de elicitación se realizó bajo las condiciones óptimas de producción de glucosinolatos, utilizando suspensiones celulares de brócoli de 100 g/L de densidad celular en las que se añadió 0,5 μM de coronatina durante 72 horas.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3, donde se puede observar que la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli fue afectada por el tratamiento con coronatina y por la adición de triptófano. El tratamiento que indujo una mayor acumulación de glucosinolatos con respecto al control fue la combinación de la coronatina con triptófano a una concentración de 200 mg/L, aunque no se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento de coronatina y 100 mg/L de triptófano. También se observó una tendencia similar en las suspensiones celulares de brócoli sin el tratamiento con coronatina, alcanzando un máximo en la producción de glucosinolatos en presencia de 200 mg/L de triptófano, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas con el resto de tratamientos control sin elicitor. Estos resultados fueron similares con los observados por Songsak y Lockwood (2004), quienes determinaron que un aumento en la concentración de

triptófano en el medio de cultivo de callos y suspensiones celulares de *N. montanum* Wall. provocó un incremento en la acumulación de indolacetonitrilo, que es un producto de hidrólisis de los glucosinolatos indólicos, alcanzando los niveles máximos en presencia de 200 mg/L de triptófano.

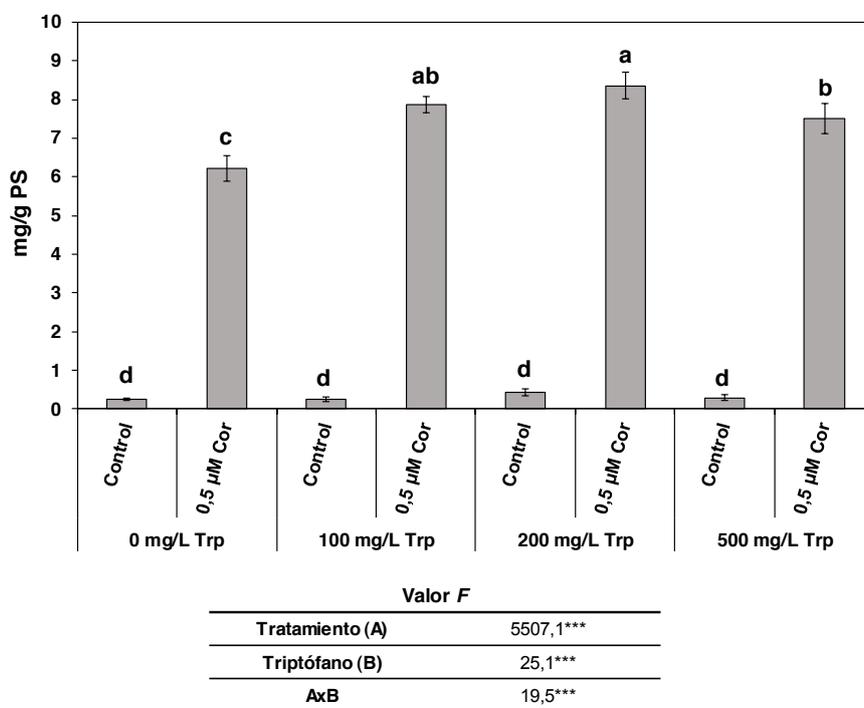


Figura 3. Producción de glucosinolatos totales expresada en mg/g de peso seco (PS) en suspensiones celulares de brócoli cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de triptófano (Trp) y elicidadas con coronatina (Cor) durante 72 horas. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento, según el test de Tukey para $p \leq 0,05$. Los valores F del test ANOVA de dos colas son significativos al nivel de probabilidad del 99,9 % (***) , 99 % (**) o 95 % (*).

Los resultados obtenidos de la medida de la viabilidad celular en las suspensiones celulares de brócoli tratadas con coronatina y triptófano se muestran en la Figura 4. La coronatina no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad, mientras que el triptófano sí afectó de forma significativa a la viabilidad de las suspensiones celulares de brócoli. Sin embargo, cabe destacar que la combinación de ambos factores no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad celular y no se observaron diferencias estadísticas entre todos los tratamientos según el test de Tukey. Estos resultados sugieren que las concentraciones utilizadas de triptófano no inducen la muerte celular, por lo que

podría resultar ventajosa la utilización de este precursor para incrementar la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli.

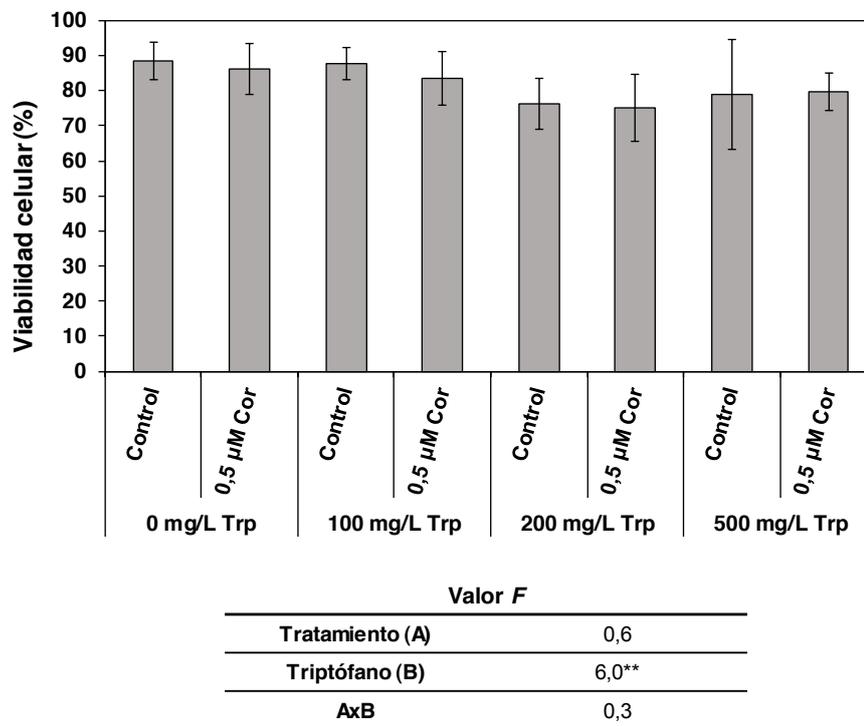


Figura 4. Viabilidad celular en suspensiones celulares de brócoli cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de triptófano (Trp) y elicidadas con coronatina (Cor) a las 48 horas de tratamiento. La viabilidad celular fue medida utilizando yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína como marcadores en un microscopio óptico equipado con filtros de fluorescencia (Duncan y Widholm, 1990). Los valores representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento, según el test de Tukey para $p \leq 0,05$. Los valores F del test ANOVA de dos colas son significativos al nivel de probabilidad del 99,9 % (***), 99 % (**) o 95 % (*).

CONCLUSIONES

A continuación, se detallan las conclusiones obtenidas de este trabajo de investigación:

- Debido a la actividad biológica de los glucosinolatos, resulta interesante desarrollar alternativas biotecnológicas al cultivo convencional para su obtención, mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Además, la producción de estos compuestos bioactivos puede ser incrementada mediante estrategias como la optimización de las condiciones de cultivo, la elicitación, la adición de precursores, la ingeniería metabólica o la transformación genética.
- La elicitación de suspensiones celulares de brócoli supone un sistema biotecnológico de producción de glucosinolatos alternativo a la extracción tradicional realizada a partir de materia prima vegetal. De entre los elicitores utilizados, la coronatina indujo un mayor incremento en la biosíntesis de los glucosinolatos, alcanzándose la producción máxima en presencia de este elicitore a una concentración de 0,5 μM a las 72 horas de tratamiento.
- La coronatina incrementó los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis y la regulación de los glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli.
- La concentración de sacarosa, junto con la composición nutricional del medio de cultivo y la densidad celular utilizada suponen factores que limitan la producción de glucosinolatos en las suspensiones celulares de brócoli. Los mayores niveles de producción de estos compuestos fueron alcanzados con el tratamiento con 0,5 μM de coronatina, utilizando una densidad celular de 100 g/L en un medio de cultivo que contenía 30 g/L de sacarosa y una mezcla de sales minerales basales de Murashige y Skoog.
- Tanto la coronatina como el jasmonato de metilo incrementaron la producción de compuestos bioactivos, en particular los compuestos fenólicos y los glucosinolatos indólicos, en las suspensiones celulares de brócoli. Al igual que en el caso de los glucosinolatos, las concentraciones más bajas de elicitores indujeron un mayor incremento en la producción

de compuestos fenólicos. Además, el tratamiento con coronatina y jasmonato de metilo alteró significativamente las actividades enzimáticas de PAL y PPO, que son enzimas clave en el metabolismo de los compuestos fenólicos.

- El incremento en la producción de compuestos bioactivos provocado por el tratamiento con elicitores se correlacionó con alteraciones en las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo antioxidante y en el estado redox del glutatión. Estos resultados, combinados con un incremento en la peroxidación de lípidos, sugirieron que la elicitación con coronatina y jasmonato de metilo conduce al establecimiento de un estrés oxidativo moderado en las suspensiones celulares de brócoli.
- El estrés oxidativo indujo la síntesis de una serie de polipéptidos relacionados con la defensa vegetal en las suspensiones celulares de brócoli.
- La disminución de GSH, asociada con el incremento en los niveles de glucosinolatos y la inducción de la proteína glutamina amidotransferasa, apoyan la hipótesis de que el GSH está directamente implicado en la biosíntesis de los glucosinolatos.
- La adición de triptófano, precursor de la ruta de biosíntesis de los glucosinolatos indólicos, provocó un incremento de la producción de estos compuestos en las suspensiones celulares de brócoli cuando este aminoácido se adicionó al medio de cultivo a una concentración de 200 mg/L.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S., 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 161-175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ahmed, E., Arshad, M., Zakriyya Khan, M., Shoaib Amjad, M., Mehreen Sadaf, H., Riaz, I., Sabir, S., Saboon, N.A., 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6, 205-214.
- Ai, L., Li, Z.H., Xie, Z.X., Tian, X.L., Eneji, A.E., Duan, L.S., 2008. Coronatine alleviates polyethylene glycol-induced water stress in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Agron. Crop Sci.* 194, 360-368. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00325.x>
- Aires, A., 2015. *Brassica* composition and food processing, Processing and Impact on Active Components in Food. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00003-2>
- Aires, A., Mota, V.R., Saavedra, M.J., Monteiro, A.A., Simões, M., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N., 2009. Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 106, 2096-2105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04181.x>
- Ali, H. galoub, Nadaf, S.K., Alkhamisi, S.A., Al-bakri, A.N., 2011. Adaptability of canola (*Brassica juncea*) varieties in different regions of Oman. *Int. J. Agric. Biol.* 13, 831-834.
- Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 25, 613-620. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6>
- Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Márquez, A., Bru, R., Pedreño, M.A., 2015. Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 361-367. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.025>
- Almagro, L., García-Pérez, P., Belchí-Navarro, S., Sánchez-Pujante, P.J., Pedreño, M.A.,

2016. New strategies for the use of *Linum usitatissimum* cell factories for the production of bioactive compounds. *Plant Physiol. Biochem.* 99, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.009>
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A., 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* 60, 377-390. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
- Almagro, L., Gutierrez, J., Pedreño, M.A., Sottomayor, M., 2014. Synergistic and additive influence of cyclodextrins and methyl jasmonate on the expression of the terpenoid indole alkaloid pathway genes and metabolites in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 119, 543-551. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0554-9>
- Anand, S., 2010. Various approaches for secondary metabolite production through plant tissue culture. *Pharmacia* 1, 1-7.
- Andréasson, E., Jørgensen, L.B., 2003. Localization of plant myrosinases and glucosinolates, en: *Recent Advances in Phytochemistry*. pp. 79-99. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(03\)80019-9](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(03)80019-9)
- Anitha, S., Ranjitha Kumari, B.D., 2006. Reserpine accumulation in NaCl treated calli of *Rauvolfia tetraphylla* L. *ScienceAsia* 32, 417-419. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2006.32.417>
- Ares, A.M., Nozal, M.J., Bernal, J., 2013. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *J. Chromatogr. A* 1313, 78-95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.051>
- Armah, C.N., Derdemezis, C., Traka, M.H., Dainty, J.R., Doleman, J.F., Saha, S., Leung, W., Potter, J.F., Lovegrove, J.A., Mithen, R.F., 2015. Diet rich in high glucoraphanin broccoli reduces plasma LDL cholesterol: Evidence from randomised controlled trials. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 918-926. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400863>
- Azevedo, H., Dias, A., Tavares, R.M., 2008. Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 93, 115-121. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9349-1>
- Babula, D., Kaczmarek, M., Ziółkowski, P.A., Sadowski, J., 2007. *Brassica oleracea*, en:

- Kole, C. (Ed.), Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 227-285. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34536-7_8
- Backs-Hüsemann, D., Reinert, J., 1970. Embryo formation by isolated single cells from tissue cultures of *Daucus carota*. *Protoplasma* 70, 49-60. <https://doi.org/10.1007/BF01276841>
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Hedayati, M., Hosseinpour-Niazi, S., Azizi, F., 2011. Broccoli sprouts reduce oxidative stress in type 2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65, 972-977. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.59>
- Bai, Y., Wang, X., Zhao, S., Ma, C., Cui, J., Zheng, Y., 2015. Sulforaphane protects against cardiovascular disease via Nrf2 activation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/407580>
- Báidez, A.G., Gómez, P., Del Río, J.A., Ortuño, A., 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3373-3377. <https://doi.org/10.1021/jf063166d>
- Barillari, J., Canistro, D., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G.F., Iori, R., Valgimigli, L., 2005. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2475-2482. <https://doi.org/10.1021/jf047945a>
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., Arora, S., 2013. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J. Plant Growth Regul.* 32, 216-232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>
- Belchí-Navarro, S., Almagro, L., Bru-Martínez, R., Pedreño, M.A., 2019. Changes in the secretome of *Vitis vinifera* cv. Monastrell cell cultures treated with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 520-527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.007>
- 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, 81-89.

<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1141-8>

- Belchí-Navarro, S., Pedreño, M.A., Corchete, P., 2011. Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaernt cell cultures treated with β -cyclodextrins. *Biotechnol. Lett.* 33, 179-184. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0406-6>
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M., 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell* 19, 148-162. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044495>
- Bhat, M.A., Ahmad, S., Aslam, J., Mujib, A., Mahmooduzzfar, 2008. Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum* L. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 17-21. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.17>
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V., 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol. Plant Pathol.* 11, 705-719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
- Bhonwong, A., Stout, M.J., Attajarusit, J., Tantasawat, P., 2009. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *J. Chem. Ecol.* 35, 28-38. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9571-7>
- Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R.M., Palazón, J., 2011. Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 104, 61-67. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9804-7>
- Branca, F., 2008. Cauliflower and broccoli. *Recipe Collect.* 997-997.
- Briceño, Z., Almagro, L., Sabater-Jara, A.B., Calderón, A.A., Pedreño, M.A., Ferrer, M.A., 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. *J. Plant Physiol.* 169, 1050-1058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.03.008>
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K., 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport

Bibliografia

- in vivo* in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126, 524-535.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.2.524>
- Brown, P.D., Tokuhsa, J.G., Reichelt, M., Gershenzon, J., 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 62, 471-481. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00549-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00549-6)
- 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, 66-71.
<https://doi.org/10.1021/jf051485j>
- Buck, P.A., 1956. Origin and taxonomy of broccoli. Econ. Bot. 10(3), 250-253.
- 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.
<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1165-0>
- Cao, J., Earle, E.D., 2003. Transgene expression in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) clones propagated *in vitro* via leaf explants. Plant Cell Rep. 21, 789-796.
<https://doi.org/10.1007/s00299-003-0589-6>
- Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P., 2011. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. Molecules 16, 251-280.
<https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S.P., 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress, en: Shanker, A., Shanker, C. (Eds.), Abiotic and biotic stress in plants - Recent advances and future perspectives. InTech, Rijeka, Croacia, pp. 463-480.
- Chavadej, S., Brisson, N., McNeil, J.N., De Luca, V., 1994. Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 91, 2166-2170.
- Chen, W., Jin, T.Z., Gurtler, J.B., Geveke, D.J., Fan, X., 2012. Inactivation of *Salmonella* on whole cantaloupe by application of an antimicrobial coating containing chitosan

- and allyl isothiocyanate. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 165-170.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.001>
- Cheng, D.L., Hashimoto, K., Uda, Y., 2004. *In vitro* digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food Chem. Toxicol.* 42, 351-357.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.09.008>
- Cheng, F., Wu, J., Cai, C., Fu, L., Liang, J., Borm, T., Zhuang, M., Zhang, Y., Zhang, F., Bonnema, G., Wang, X., 2016. Genome resequencing and comparative variome analysis in a *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* collection. *Sci. Data* 3, 1-9.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2016.119>
- Cheng, Y.M., Tsai, C.C., Hsu, Y.C., 2016. Sulforaphane, a dietary isothiocyanate, induces G2/M arrest in cervical cancer cells through cyclinB1 downregulation and GADD45 β /CDC2 association. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1-13.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091530>
- Cheong, J.J., Choi, Y. Do, 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* 19, 409-413. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00138-0)
- Chew, O., Whelan, J., Millar, A.H., 2003. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869-46877.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200>
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Cochrane, F.C., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557-1564. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.05.006>
- Cotrim, C.A., De Oliveira, S.C.B., Diz Filho, E.B.S., Fonseca, F.V., Baldissera, L., Antunes, E., Ximenes, R.M., Monteiro, H.S.A., Rabello, M.M., Hernandez, M.Z., De Oliveira Toyama, D., Toyama, M.H., 2011. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem. Biol. Interact.* 189, 9-16.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.10.016>

Bibliografia

- Couvreur, T.L.P., Franzke, A., Al-Shehbaz, I.A., Bakker, F.T., Koch, M.A., Mummenhoff, K., 2010. Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.* 27, 55-71. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp202>
- Cusido, R.M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A.B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Angeles Pedreño, M., Palazon, J., 2014. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnol. Adv.* 32, 1157-1167. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.002>
- Dao, T.T.H., Linthorst, H.J.M., Verpoorte, R., 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* 10, 397-412. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9211-7>
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Das, P., Nutan, K.K., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2015. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: Dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Front. Environ. Sci.* 2, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00070>
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R., 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 268-281. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026971>
- Dehghan, S., Sadeghi, M., Oppel, A.P., Fischer, R., Lakes-Harlan, R., Kavousi, H.R., Vilcinskas, A., Rahnamaeian, M., 2014. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Biosci. Rep.* 34, 273-282. <https://doi.org/10.1042/BSR20140026>
- Dietz, K.J., Turkan, I., Krieger-Liszkay, A., 2016. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiol.* 171, 1541-1550. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00375>
- Dinkova-Kostova, A.T., Kostov, R. V., 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol. Med.* 18, 337-347.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.003>

- Dixit, G., Praveen, A., Tripathi, T., Yadav, V.K., Verma, P.C., 2017. Herbivore-responsive cotton phenolics and their impact on insect performance and biochemistry, *Journal of Asia-Pacific Entomology*. Elsevier B.V. on behalf of Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.02.002>
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R., 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859-30869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202919200>
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R., 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338-350. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012>
- Duncan, D.R., Widholm, J.M., 1990. Measurements of viability suitable for plant tissue cultures, en: Pollard, J.W., Walker, J.M. (Eds.), . Humana Press, Totowa, NJ, pp. 29-37. <https://doi.org/10.1385/0-89603-161-6:29>
- Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R., Kanner, J., 2011. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 2319-2327. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.033>
- Fahey, J.W., Stephenson, K.K., Wade, K.L., Talalay, P., 2013. Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.126>
- FAOSTAT [WWW Document], 2017. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accedido 1.16.20).
- Farmer, E.E., Ryan, C.A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134. <https://doi.org/10.2307/3869566>
- Farnham, M.W., Björkman, T., 2011a. Evaluation of experimental broccoli hybrids developed for summer production in the Eastern United States. *HortScience* 46, 858-863. <https://doi.org/10.21273/hortsci.46.6.858>

- Farnham, M.W., Björkman, T., 2011b. Breeding vegetables adapted to high temperatures: A case study with broccoli. *HortScience* 46, 1093-1097. <https://doi.org/10.21273/hortsci.46.8.1093>
- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R.M., Zamani, Z., Palazon, J., 2013. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. *Ind. Crops Prod.* 50, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.029>
- Fay, M.F., 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodivers. Conserv.* 3, 176-183. <https://doi.org/10.1007/BF02291887>
- Fehér, A., 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Ferreira Holderbaum, D., Kon, T., Kudo, T., Pedro Guerra, M., 2010. Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience* 45, 1150-1154.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R., 2009. (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Montesano, R., Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 2916-2921.
- Franzke, A., Koch, M.A., Mummenhoff, K., 2016. Turnip time travels: age estimates in Brassicaceae. *Trends Plant Sci.* 21, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.024>
- Franzke, A., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A., Mummenhoff, K., 2011. Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci.* 16, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.005>
- Freitag, M., Galoppini, E., 2011. Molecular host-guest complexes: Shielding of guests on semiconductor surfaces. *Energy Environ. Sci.* 4, 2482-2494.

<https://doi.org/10.1039/c0ee00396d>

- Fuentes, F., Paredes-Gonzalez, X., Kong, A.N.T., 2015. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: antioxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and *in vivo* cancer chemopreventive efficacy. *Curr. Pharmacol. Reports* 1, 179-196. <https://doi.org/10.1007/s40495-015-0017-y>
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S., 2013. Plant defense against insect herbivores, *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>
- García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P.S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., González-Gallego, J., 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* 557, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.014>
- Gautam, M., Ge, X., Li, Z., 2014. *Brassica*, en: Pratap, A., Kumar, J. (Eds.), *Alien gene transfer in crop plants*, volume 2. Springer New York, New York, NY, pp. 207-229. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9572-7_10
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chem.* 105, 1047-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.012>
- Georgiev, M.I., Pavlov, A.I., Bley, T., 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 1175-1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>
- Geu-Flores, F., Møldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D., Halkier, B.A., 2011. Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 2456-2469. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083998>
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N., 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* 5, 6697-6703. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.363>

- Gijzen, M., Séguin-Swartz, G., Ian McGregor, D., 1994. Glucosinolate metabolism in rapeseed embryos: effect of feeding glucosinolate precursors and uptake of glucosinolate by different plant cultivars. *J. Plant Physiol.* 144, 17-21. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80985-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80985-5)
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gliszczyńska-Świgło, A., Ciska, E., Pawlak-Lemańska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T., Tyrakowska, B., 2006. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Addit. Contam.* 23, 1088-1098. <https://doi.org/10.1080/02652030600887594>
- Gray, A.R., 1982. Taxonomy and evolution of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Econ. Bot.* 36, 397-410. <https://doi.org/10.1007/BF02862698>
- Green, J.P., Foster, R., Wilkins, L., Osorio, D., Hartley, S.E., 2015. Leaf colour as a signal of chemical defence to insect herbivores in wild cabbage (*Brassica oleracea*). *PLoS One* 10, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136884>
- 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 LP - 2393.
- Gupta, K.J., Igamberdiev, A.U., 2016. Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview, en: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*. Springer, Cham, pp. 1-14. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10079-1>
- Guzmán-Pérez, V., Bumke-Vogt, C., Schreiner, M., Mewis, I., Borchert, A., Pfeiffer, A.F.H., 2016. Benzylglucosinolate derived isothiocyanate from *Tropaeolum majus* reduces gluconeogenic gene and protein expression in human cells. *PLoS One* 11, 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162397>
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>

- Harvey, J.A., van Dam, N.M., Raaijmakers, C.E., Bullock, J.M., Gols, R., 2011. Tri-trophic effects of inter- and intra-population variation in defence chemistry of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Oecologia* 166, 421-431. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1861-4>
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Teixeira da Silva, J.A., Fujita, M., 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor, en: *Crop stress and its management: Perspectives and strategies*. Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 261-315. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0>
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R., 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 1415-1422. <https://doi.org/10.1038/nbt1027>
- Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S., 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiol.* 24, 1303-1311. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1303>
- Hernández, J.A., Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, Pedro, 2017. Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants, en: Hossain, M.A., Mostofa, M.G., Diaz-Vivancos, P., Burritt, D.J., Fujita, M., Tran, L.-S.P. (Eds.), *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Springer, Nueva York, EEUU, pp. 309-329. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2>
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42, 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Höxtermann, E., 2003. Cellular 'elementary organisms' *in vitro*: The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization. *Plant Tissue Cult.* 1898, 67-91. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_4
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., Saeed, M., 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4, 10-20. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92725>
- Hyun, M.W., Yun, Y.H., Kim, J.Y., Kim, S.H., 2011. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* 39, 257-265.

<https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.257>

- Ibarra, M., Pérez-Vizcaíno, F., Cogolludo, A., Duarte, J., Zaragoza-Arnáez, F., López-López, J.G., Tamargo, J., 2002. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med.* 68, 307-310. <https://doi.org/10.1055/s-2002-26752>
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y., 2014. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed. Sci.* 64, 48-59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jain, S., Kumar, A., 2015. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Adv. Plants Agric. Res.* 3, 00077. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00077>
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol. Plant.* 31, 427-436. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0275-6>
- Jeandet, P., 2015. Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules* 20, 2770-2774. <https://doi.org/10.3390/molecules20022770>
- Jeffery, E.H., Araya, M., 2009. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochem. Rev.* 8, 283-298. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9106-4>
- Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheski, N., Klein, B.P., Juvik, J.A., 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *J. Food Compos. Anal.* 16, 323-330. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00045-0)
- Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., Lee, Y.J., 2009. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J. Cell. Biochem.* 106, 73-82. <https://doi.org/10.12989/was.2016.22.2.253>
- Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J.S., Choi, Y. Do, Cheong, J.J., 2007. Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 26, 1053-1063. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0311-1>
- Kalra, E.K., 2003. Nutraceutical - Definition and introduction. *AAPS PharmSciTech* 5,

1-2.

- Kang, L., Ding, L., Wang, Z.-Y., 2009. Isothiocyanates repress estrogen receptor α expression in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 21, 185-192. <https://doi.org/10.3892/or>
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plants Res.* 3, 1222-1239.
- Katsir, L., Schilmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., Howe, G.A., 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7100 LP - 7105.
- Khan, M.A.M., Ulrichs, C., Mewis, I., 2011. Effect of water stress and aphid herbivory on flavonoids in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *J. Appl. Bot. Food Qual.* 84, 178-182.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18, 2328-2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kim, D.S., Hwang, B.K., 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J. Exp. Bot.* 65, 2295-2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>
- Kim, H.N., Cha, J.S., Cho, T., Kim, H.Y., 2011. Salicylic acid and wounding induce defense-related proteins in Chinese cabbage. *Korean J. Biol. Sci.* 7, 213-219. <https://doi.org/10.1080/12265071.2003.9647707>
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 229-245. <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X>
- Kim, J.-Y., Kim, H.-Y., Jeon, J.Y., Kim, D.-M., Zhou, Y., Lee, J.S., Lee, H., Choi, H.-K., 2017. Effects of coronatine elicitation on growth and metabolic profiles of *Lemna paucicostata* culture. *PLoS One* 12, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0384-9>
- Kim, J.H., Botella, J.R., 2002. Callus induction and plant regeneration from broccoli

- (*Brassica oleracea* var. *italica*) for transformation. J. Plant Biol. 45, 177-181. <https://doi.org/10.1007/bf03030311>
- Kliebenstein, D.J., 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. Plant Cell Environ. 27, 675-684.
- Koch, M., Al-shehbaz, I. a, Mummenhoff, K., 2003. Molecular systematics, evolution and population biology in the mustard family (Brassicaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 90, 151-171.
- Koh, E., Wimalasiri, K.M.S., Chassy, A.W., Mitchell, A.E., 2009. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. J. Food Compos. Anal. 22, 637-643. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.019>
- Kolupaev, Y.E., Karpets, Y. V, Kabashnikova, L.F., 2019. Antioxidative system of plants: Cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). Appl. Biochem. Microbiol. 55, 441-459. <https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
- Kumar, D., Kumar, G., Das, R., Kumar, R., Agrawal, V., 2018. *In vitro* elicitation, isolation, and characterization of conessine biomolecule from *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. callus and its larvicidal activity against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 6783-6796. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1038-3>
- Kumar, P., Srivastava, D.K., 2016. Biotechnological applications in *in vitro* plant regeneration studies of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. Biotechnol. Lett. 38, 561-571. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2031-x>
- Kushad, M.M., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Juvik, J.A., Klein, B.P., Wallig, M.A., Jeffery, E.H., 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. J. Agric. Food Chem. 47, 1541-1548. <https://doi.org/10.1021/jf980985s>
- Labate, J.A., Robertson, L.D., Baldo, A.M., Björkman, T., 2006. Inflorescence identity gene alleles are poor predictors of inflorescence type in broccoli and cauliflower. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 131, 667-673. <https://doi.org/10.21273/jashs.131.5.667>
- 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*. <https://doi.org/10.1080/19439342.2018.1452778>
- Lazzeri, P.A., Dunwell, J.M., 1986. *In vitro* regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea* var. *italica* plenck cv. green comet ii. effect of light conditions and explant size. *Ann. Bot.* 58, 699-710. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087233>
- Lazzeri, P.A., Dunwell, J.M., 1984. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultivars. *Ann. Bot.* 54, 341-350. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086804>
- Lee-Parsons, C.W.T., Ertürk, S., Tengtrakool, J., 2004. Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnol. Lett.* 26, 1595-1599. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045825.37395.94>
- Lee, J.E., Bae, I.Y., Lee, H.G., Yang, C.B., 2006. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). *Food Chem.* 99, 143-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.050>
- Leonardo, C.C., Doré, S., 2011. Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. *Nutr. Neurosci.* 14, 226-236. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000013>
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, Jiang, D.A., 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933-8952. <https://doi.org/10.3390/molecules15128933>
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J.M., Bru, R., Pedrão, 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, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-132>
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K.M., 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.06.004>

Bibliografía

- Liu, R.H., 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 78, 3-6. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.517S>
- López-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2007. Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10001-10007. <https://doi.org/10.1021/jf071680t>
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M.C., García-Viguera, C., Carvajal, M., 2008. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Sci.* 174, 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.012>
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M.C., Moreno, D.A., Carvajal, M., García-Viguera, C., 2009. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 57, 572-578. <https://doi.org/10.1021/jf802994p>
- Lopez, L., Wolf, E.M., Pires, J.C., Edger, P.P., Koch, M.A., 2017. Molecular resources from transcriptomes in the Brassicaceae family. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01488>
- Lukens, L.N., Quijada, P.A., Udall, J., Pires, J.C., Schranz, M.E., Osborn, T.C., 2004. Genome redundancy and plasticity within ancient and recent *Brassica* crop species. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 665-674. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00352.x>
- Maldini, M., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., Natella, F., 2012. A liquid chromatography-mass spectrometry approach to study «glucosinoloma» in broccoli sprouts. *J. Mass Spectrom.* 47, 1198-1206. <https://doi.org/10.1002/jms.3028>
- Malik, S., Cusidó, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazón, J., Bonfill, M., 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochem.* 46, 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.004>
- Maroto, J. V., López Galarza, S., San Bautista, A., 1996. Germination of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica* Plenck) in different seedbed conditions during summer in the Spanish Mediterranean coast. *Acta Hort.* 407, 321-326. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1996.407.40>

- Martínez-Ballesta, M.C., Moreno, D.A., Carvajal, M., 2013. The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms140611607>
- Martínez-Márquez, A., Morante-Carriel, J.A., Ramírez-Estrada, K., Cusidó, R.M., Palazon, J., Bru-Martínez, R., 2016. Production of highly bioactive resveratrol analogues pterostilbene and piceatannol in metabolically engineered grapevine cell cultures. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1813-1825. <https://doi.org/10.1111/pbi.12539>
- Matkowski, A., 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 548-560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- McVetty, P.B.E., Duncan, R.W., 2015. Canola, rapeseed, and mustard: for biofuels and bioproducts. *Ind. Crop. Breed. Bioenergy Bioprod.* 133-156. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1447-0>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [WWW Document], 2018. URL <https://www.mapa.gob.es/es/> (accedido 1.16.20).
- Miras-Moreno, B., Almagro, L., Pedreño, M.A., Sabater-Jara, A.B., 2016. Enhanced accumulation of phytosterols and phenolic compounds in cyclodextrin-elicited cell suspension culture of *Daucus carota*. *Plant Sci.* 250, 154-164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.008>
- Mishra, R., Rao, G.J.N., 2016. *In-vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. *Rice Sci.* 23, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
- Moreno, D.A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C., 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1508-1522. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.003>
- Mourato, M.P., Moreira, I.N., Leitão, I., Pinto, F.R., Sales, J.R., Martins, L.L., 2015. Effect of heavy metals in plants of the genus *Brassica*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 17975-17998. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>
- Mukherjee, V., Mishra, P.K., 2012. Broccoli-an underexploited nutraceutical. *Sci Res Report.* 2, 291-294.
- Nakamura, Y., Paetz, C., Brandt, W., David, A., Rendón-Anaya, M., Herrera-Estrella, A., Mithöfer, A., Boland, W., 2014. Synthesis of 6-substituted 1-oxoindanoyl isoleucine

- conjugates and modeling studies with the COI1-JAZ co-receptor complex of lima bean. *J. Chem. Ecol.* 40, 687-699. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0469-2>
- Navarro, S.L., Li, F., Lampe, J.W., 2011. Mechanisms of action of isothiocyanates in cancer chemoprevention: an update. *Food Funct.* 2, 579-587. <https://doi.org/10.1039/c1fo10114e>
- Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F.S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M., 2018. The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 233, 460-478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.038>
- Neugart, S., Fiol, M., Schreiner, M., Rohn, S., Zrenner, R., Kroh, L.W., Krumbein, A., 2014. Interaction of moderate UV-B exposure and temperature on the formation of structurally different flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *J. Agric. Food Chem.* 62, 4054-4062. <https://doi.org/10.1021/jf4054066>
- Neugart, S., Krumbein, A., Zrenner, R., 2016. Influence of light and temperature on gene expression leading to accumulation of specific flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00326>
- Newton, E., Bullock, J.M., Hodgson, D., 2010. Temporal consistency in herbivore responses to glucosinolate polymorphism in populations of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Oecologia* 164, 689-699. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1702-5>
- Newton, E.L., Bullock, J.M., Hodgson, D.J., 2009. Glucosinolate polymorphism in wild cabbage (*Brassica oleracea*) influences the structure of herbivore communities. *Oecologia* 160, 63-76. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1281-5>
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
- Novío, S., Núñez-Iglesias, M.J., Freire-Garabal, M., 2019. Isothiocyanates, epigenetics, and cancer prevention. *Epigenetics Cancer Prev.* 149-168.

- <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812494-9.00007-x>
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S.M., Jang, M.O., Jin, Y.W., Lee, E.K., Loake, G.J., 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep.* 49, 149-158. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>
- Ohri, P., Pannu, S.K., 2010. Effect of phenolic compounds on nematodes- A review. *J. Appl. Nat. Sci.* 2, 344-350. <https://doi.org/10.31018/jans.v2i2.144>
- Onay, O., Koçkar, O.M., 2004. Fixed-bed pyrolysis of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biomass and Bioenergy* 26, 289-299. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00123-5)
- Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Goossens, A., Palazón, J., 2013. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 170, 211-219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.004>
- Ozcan, T., Akpınar-Bayızit, A., Yılmaz-Ersan, L., Delikanlı, B., 2014. Phenolics in human health. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 5, 393-396. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2014.v5.416>
- Pan, M.H., Lai, C.S., Ho, C.T., 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 1, 15-31. <https://doi.org/10.1039/c0fo00103a>
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pang, C.-H., Bao-Shan, W., 2010. Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants, en: Anjum, N.A., Chan, M.-T., Umar, S. (Eds.), *Ascorbate-gutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer Netherlands, pp. 91-113. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9>
- Parvez, M.M., Tomita-Yokotani, K., Fujii, Y., Konishi, T., Iwashina, T., 2004. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 631-635. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.12.002>
- Paunescu, A., 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview. *Rom. Biotechnol. Lett.* 14, 4095-4103.

Bibliografía

- Pedras, M.S.C., Adio, A.M., 2008. Phytoalexins and phytoanticipins from the wild crucifers *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*: Rapalexin A, wasalexins and camalexin. *Phytochemistry* 69, 889-893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.032>
- Pedras, M.S.C., Okinyo-Owiti, D.P., Thoms, K., Adio, A.M., 2009. The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: *De novo* incorporation of deuterated tryptophans and quasi-natural compounds. *Phytochemistry* 70, 1129-1138. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.015>
- Perassolo, M., Smith, M.E., Giulietti, A.M., Rodríguez Talou, J., 2016. Synergistic effect of methyl jasmonate and cyclodextrins on anthraquinone accumulation in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Rubia tinctorum*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 124, 319-330. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0896-y>
- Pereira, F.M.V., Rosa, E., Fahey, J.W., Stephenson, K.K., Carvalho, R., Aires, A., 2002. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6239-6244. <https://doi.org/10.1021/jf020309x>
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2010. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 31, 478-494. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.002>
- Pichersky, E., Gang, D.R., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5, 439-445. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)
- Pitta-Alvarez, S.I., Giulietti, A.M., 1995. Advantages and limitations in the use of hairy root cultures for the production of tropane alkaloids: Use of anti-auxins in the maintenance of normal root morphology. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 31, 215-220. <https://doi.org/10.1007/BF02632025>
- Proexport [WWW Document], 2018. URL <https://www.proexport.es/agrocifras-coles/> (accedido 1.16.20).
- Qin, Y., Li, H.L., Guo, Y.D., 2007. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 111, 203-208.

- <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.022>
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24, 361-375. <https://doi.org/10.1080/87559120802089332>
- Rakow, G., 2004. Species origin and economic importance of *Brassica*, en: *Brassica*. Springer, Heidelberg, pp. 3-11. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06164-0_1
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Ramirez-Estrada, K., Osuna, L., Moyano, E., Bonfill, M., Tapia, N., Cusido, R.M., Palazon, J., 2015. Changes in gene transcription and taxane production in elicited cell cultures of *Taxus media* and *Taxus globosa*. *Phytochemistry* 117, 174-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.013>
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, M.R., Palazon, J., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J., 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 42, 93-114. <https://doi.org/10.1023/A:1006380021658>
- Raso, G.M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R., 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 68, 921-931. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00999-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00999-1)
- Ravanfar, S.A., Aziz, M.A., Kadir, M.A., Rashid, A.A., Sirchi, M.H.T., 2009. Plant regeneration of *Brassica oleracea* subsp. *italica* (broccoli) CV Green Marvel as affected by plant growth regulators. *African J. Biotechnol.* 8, 2523-2528. <https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9304>
- Rehman, F., Khan, F.A., Badruddin, S.M.A., 2012. Role of phenolics in plant defense against insect herbivory, en: Springer (Ed.), *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*. Heidelberg, Berlin, pp. 309-313.

<https://doi.org/10.1007/978>

Rizzello, F., De Paolis, A., Durante, M., Blando, F., Mita, G., Caretto, S., 2014. Enhanced production of bioactive isoprenoid compounds from cell suspension cultures of *Artemisia annua* L. using β -cyclodextrins. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 19092-19105. <https://doi.org/10.3390/ijms151019092>

Robertson, D., Earle, E.D., 1986. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* CV Green Comet broccoli. *Plant Cell Rep.* 5, 61-64. <https://doi.org/10.1007/BF00269720>

Rubin, E., Aziz, Z.A., Surugau, N., 2018. Glucosinolates content in non-elicited plant culture, elicited plant culture and wild plant of watercress (*Nasturtium officinale*) 5, 40-45.

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Winefield, C., Markham, K.R., 2001. Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 56, 745-754. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-9-1013>

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. <https://doi.org/10.4161/psb.6.3.14451>

Sabater-Jara, A.B., Almagro, L., Pedreño, M.A., 2014a. Induction of extracellular defense-related proteins in suspension cultured-cells of *Daucus carota* elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* 77, 133-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.006>

Sabater-Jara, A.B., Onrubia, M., Moyano, E., Bonfil, M., Palazón, J., Pedreño, M.A., Cusidó, R.M., 2014b. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant Biotechnol. J.* 12, 1075-1084. <https://doi.org/10.1111/pbi.12214>

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. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0320-4>

Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., Manzanares-Dauleux, M.J., 2008.

- Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Sci.* 174, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.09.012>
- Samanta, A., Das, G., Das, S., 2011. Roles of flavonoids in plants. *Int. J. Pharm. Sci. Technol.* 100, 6.
- Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., Noguera, P., Abad, M., Antón, A., 2004. Composts as media constituents for vegetable transplant production. *Compost Sci. Util.* 12, 161-168. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2004.10702175>
- Sánchez-Pujante, P.J., Miras-Moreno, B., Soluyanova, P., Garre, V., Pedreño, M.Á., Almagro, L., 2017. Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*. *Mycol. Prog.* 16, 507-512. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1278-0>
- Saw, C.L.L., Guo, Y., Yang, A.Y., Paredes-Gonzalez, X., Ramirez, C., Pung, D., Kong, A.N.T., 2014. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food Chem. Toxicol.* 72, 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.038>
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101, 7-12.
- Schaller, A., Stintzi, A., 2009. Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70, 1532-1538. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.032>
- Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A., 2004. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* 23, 179-199. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0047-x>
- Senanayake, G.V.K., Banigesh, A., Wu, L., Lee, P., Juurlink, B.H.J., 2012. The dietary phase 2 protein inducer sulforaphane can normalize the kidney epigenome and improve blood pressure in hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 25, 229-235. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.200>
- Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, P.M., 2016. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci.* 7, 1-21.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00187>

Shao, H. bo, Chu, L. ye, Shao, M. an, Jaleel, C.A., Hong-mei, M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus - Biol.* 331, 433-441. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.03.011>

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M., 2007. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 20, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.002>

Sissi 100 % Organic [WWW Document], s. f. URL <https://www.sissi.co.za/catalogue/healing-herb-salt-crystals/wild-mustard,-mint-and-thyme-300g-detail> (accedido 1.14.20).

Skadhauge, B., Thomsen, K.K., Von Wettstein, D., 1997. The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 126, 147-160. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1997.00147.x>

Skoog, F., Miller, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-130.

Skoog, F., Tsui, C., 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 35, 782-787. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1948.tb08148.x>

Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J., Pietraszek, J., 2014. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *Acta Biochim. Pol.* 61, 47-53.

Soengas, P., Sotelo, T., Velasco, P., Cartea, M.E., 2011. Antioxidant properties of *Brassica* vegetables. *Funct. plant Sci. Biotechnol.* 5, 43-55.

Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., Halkier, B.A., 2010. Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 15, 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.005>

- Songsak, T., Lockwood, G.B., 2004. Production of two volatile glucosinolate hydrolysis compounds in *Nasturtium montanum* and *Cleome chelidonii* plant cell cultures. *Fitoterapia* 75, 296-301. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.007>
- Stauber, E.J., Kuczka, P., van Ohlen, M., Vogt, B., Janowitz, T., Piotrowski, M., Beuerle, T., Wittstock, U., 2012. Turning the «mustard oil bomb» into a «cyanide bomb»: Aromatic glucosinolate metabolism in a specialist insect herbivore. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035545>
- Steingroewer, J., Bley, T., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., Pavlov, A., 2013. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci.* 13, 26-38. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100226>
- Steward, F.C., 1958. Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Am. J. Bot.* 45, 709. <https://doi.org/10.2307/2439729>
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shetty, H.S., 2012. Pathogenesis related proteins in plant defense response, en: Mérillon, J.M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Plant Defence: Biological Control*. Springer Netherlands, pp. 379-403. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0>
- Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G., Kocsy, G., 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J. Plant Growth Regul.* 28, 66-80. <https://doi.org/10.1007/s00344-008-9075-2>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. Secondary metabolites and plant defense, en: *Plant Physiology* Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Takahata, Y., Keller, W.A., 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci.* 74, 235-242. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90051-9)
- Tang, P., Sun, Q., Suo, Z., Zhao, L., Yang, H., Xiong, X., Pu, H., Gan, N., Li, H., 2018. Rapid and efficient removal of estrogenic pollutants from water by using beta- and gamma-cyclodextrin polymers. *Chem. Eng. J.* 344, 514-523. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.127>
- Tanito, M., Masutani, H., Kim, Y.C., Nishikawa, M., Ohira, A., Yodoi, J., 2005.

Bibliografía

- Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 979-987. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1120>
- Taticek, R.A., Moo-Young, M., Legge, R.L., 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 24, 139-158. <https://doi.org/10.1007/BF00039742>
- Textor, S., Gershenzon, J., 2009. Herbivore induction of the glucosinolate-myrosinase defense system: Major trends, biochemical bases and ecological significance. *Phytochem. Rev.* 8, 149-170. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9117-1>
- Theis, N., Lerchau, M., 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.* 164, S93-S102.
- Thorpe, T.A., 2007. History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* 37, 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Thorpe, T.A., 1994. Morphogenesis and Regeneration, en: Vasil, I.K., Thorpe, T.A. (Eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, pp. 17-36. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_2
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853-876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K.I., 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15362-15367. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15362>
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F., García-Viguera, C., 2003a. Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3029-3034. <https://doi.org/10.1021/jf021065j>
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., García-Viguera, C., 2003b. Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *J. Sci. Food Agric.* 83, 1511-1516. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1585>
- Van Den Driessche, J.J., Plat, J., Mensink, R.P., 2018. Effects of superfoods on risk

- factors of metabolic syndrome: A systematic review of human intervention trials. *Food Funct.* 9, 1944-1966. <https://doi.org/10.1039/c7fo01792h>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Vandenborre, G., Smagghe, G., Van Damme, E.J.M., 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* 72, 1538-1550. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>
- Varela, M.C., Arslan, I., Reginato, M.A., Cenzano, A.M., Luna, M.V., 2016. Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina), *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.014>
- Vasconsuelo, A., Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172, 861-875. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>
- Vasil, I.K., 2008. A history of plant biotechnology: From the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.* 27, 1423-1440. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4>
- Vazquez-Prieto, M.A., Miatello, R.M., 2010. Organosulfur compounds and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 31, 540-545. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.009>
- Vig, A.P., Rampal, G., Thind, T.S., Arora, S., 2009. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 1561-1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Wang, L., Tu, Y.C., Lian, T.W., Hung, J.T., Yen, J.H., Wu, M.J., 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9798-9804. <https://doi.org/10.1021/jf0620719>
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7, 1306-1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>

Bibliografia

- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., F. Bublitz, 1994. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. FEBS Lett. 345, 9-13. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00411-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00411-0)
- White, P.R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9, 585-600. <https://doi.org/10.1104/pp.9.3.585>
- Wielanek, M., Urbanek, H., 2006. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 86, 177-186. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9106-2>
- Wielanek, M., Urbanek, H., 1999. Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 57, 39-45. <https://doi.org/10.1023/A:1006398902248>
- Wiesner, M., Schreiner, M., Zrenner, R., 2014. Functional identification of genes responsible for the biosynthesis of 1-methoxy-indol-3-ylmethyl-glucosinolate in *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. BMC Plant Biol. 14, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-124>
- Wink, M., 2008. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. Nat. Prod. Commun. 3, 1205-1216.
- Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L., Zhang, M., 2012. Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. J. Plant Growth Regul. 31, 113-123. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9224-x>
- Wu, L., Ashraf, M.H.N., Facci, M., Wang, R., Paterson, P.G., Ferrie, A., Juurlink, B.H.J., 2004. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 7094-7099. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402004101>
- Xiang, Y., Song, M., Wei, Z., Tong, J., Zhang, L., Xiao, L., Ma, Z., Wang, Y., 2011. A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defence system. J. Exp. Bot. 62, 5471-5483. <https://doi.org/10.1093/jxb/err226>

- Xiao, D., Srivastava, S.K., Lew, K.L., Zeng, Y., Hershberger, P., Johnson, C.S., Trump, D.L., Singh, S. V., 2003. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis* 24, 891-897. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg023>
- Xie, Z., Duan, L., Tian, X., Wang, B., Egrinya Eneji, A., Li, Z., 2008. Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity. *J. Plant Physiol.* 165, 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.001>
- Xu, Y., Chang, P.F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6, 1077-1085. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1077>
- Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T., Qin, L.P., 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 215-232. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>
- Zabala, M.A., Angarita, M., Restrepo, J.M., Caicedo, L.A., Perea, M., 2010. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 46, 233-238. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9249-z>
- Zakkar, M., Van Der Heiden, K., Luong, L.A., Chaudhury, H., Cuhlmann, S., Hamdulay, S.S., Krams, R., Edirisinghe, I., Rahman, I., Carlsen, H., Haskard, D.O., Mason, J.C., Evans, P.C., 2009. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1851-1857. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193375>
- Zenkteler, M., Zenkteler, E., Dostatnia, I., 2006. Somatic embryogenesis From broccoli stigmas in tissue culture. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.* 121-125.
- Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
- Zhang, X., Liu, C.J., 2015. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine

Bibliografia

ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Mol. Plant* 8, 17-27.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.001>

Ziyan, L., Yongmei, Z., Nan, Z., Ning, T., Baolin, L., 2007. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med.* 73, 221-226. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967122>