

Ácido benzoico: biosíntesis, modificación y función en plantas*

Benzoic acid: biosynthesis, modification and function in plants

Lidia Valdez Sepúlveda¹, Susana González-Morales¹ y Adalberto Benavides Mendoza^{1§}

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Horticultura. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315. Tel: 01 844 411 0215. (lgvsk8@hotmail.com; qfb_sgm@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: abenmen@gmail.com.

Resumen

El ácido benzoico, se encuentra de forma natural en las plantas desempeñando importantes papeles en el metabolismo. A pesar de la importancia del BA como un precursor para una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios, la biosíntesis y sus derivaciones metabólicas en plantas no han sido totalmente dilucidadas. El objetivo de este trabajo, es presentar los avances reportados en la literatura científica acerca de este compuesto, su biosíntesis, modificación y función en plantas. Es probable que existan varias vías biosintéticas del BA en una especie determinada. La evidencia creciente sugiere que el BA en las plantas es sintetizado directamente del shiquimato/corismato y de la fenilalanina; sin embargo, se han identificado pocos genes en estas vías. Aplicado en plantas superiores, el BA modifica el crecimiento, la tolerancia al estrés y la anatomía y morfología de especies comestibles y ornamentales.

Palabras clave: corismato, fenilpropanoide, shiquimato, vía biosintética.

Introducción

El ácido benzoico (BA), es un ácido carboxílico aromático que se encuentra de forma natural en las plantas, desempeñando importantes papeles en cuanto al crecimiento. Su biosíntesis

Abstract

Benzoic acid is found naturally in plants playing an important role in metabolism. Despite the importance of BA as a precursor for a wide range of primary and secondary metabolites, the biosynthesis and its metabolic derivatives in plants have not been fully elucidated. The aim of this paper is to present the progress reported in scientific literature on this compound, its biosynthesis, modification and function in plants. It is likely that there are several biosynthetic pathways of BA in a given species. Growing evidence suggests that BA in plants is synthesized directly from the shikimate/chorismate and phenylalanine; however, few genes have been identified in these pathways. Applied in higher plants, BA modifies growth, stress tolerance, anatomy and morphology of edible and ornamental species.

Keywords: biosynthetic pathway, chorismate, phenylpropanoid, shikimate.

Introduction

Benzoic acid (BA) is an aromatic carboxylic acid which is found naturally in plants, playing an important role in growth. Its biosynthesis is located in the phenylpropanoids pathway and it is a precursor for a wide range of primary

* Recibido: enero de 2015
Aceptado: abril de 2015

se ubica en la vía de los fenilpropanoides y es precursor para una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios (Qualley *et al.*, 2012). Además, participa en las señales internas que regulan la respuesta de defensa de las plantas frente a diversas condiciones bióticas y abióticas (Williams *et al.*, 2003; Senaratna *et al.*, 2003). Sus sales y ésteres son conocidos como benzoatos.

El BA y sus derivados son elementos estructurales en un gran número de metabolitos y productos naturales realizando funciones críticas en las plantas, como reguladores de crecimiento, compuestos defensivos y atrayentes de polinizadores (Qualley *et al.*, 2012). Por otra parte, en los procesos industriales se utilizan ampliamente como conservantes y potenciadores del sabor, analgésicos, antisépticos y quimioterapéuticos (Quan *et al.*, 1996; Chipley, 2005). A pesar de su sencilla estructura y amplia distribución, la comprensión de las vías bioquímicas que conducen a la formación del BA sigue siendo incompleta. Por lo tanto, el conocimiento de la biosíntesis y modificación del BA en las plantas, es un paso crucial para entender la regulación y la función de esta importante molécula. Por lo que un primer objetivo de este trabajo, es presentar los avances reportados en la literatura científica acerca de este compuesto, su biosíntesis, modificación y función. Asimismo, un segundo objetivo es comparar los trabajos realizados utilizando este compuesto con lo reportado para el ácido salicílico (SA), un compuesto análogo encontrado en la vía de los fenilpropanoides.

Ácido benzoico

El BA (C_6H_5COOH) es un ácido carboxílico aromático que tiene un grupo carboxilo unido a un anillo fenólico (Figura 1). Fue descubierto en el siglo XVI en la goma de benjuí (resina extraída de la corteza de varias especies de árboles del género *Styrax*) (Neumüller, 1988). Se produce naturalmente como lo hacen sus ésteres en muchas especies animales y vegetales, reportándose en estos últimos en frutas y bayas (Zuo *et al.*, 2002).

En las plantas, el BA parece desempeñar importantes papeles en el metabolismo al regular el crecimiento y la modificación química de la rizosfera formando parte de los exudados radicales (Elliott and Cheng, 1987) que aumentan la capacidad de captura de minerales (Maffei *et al.*, 1999); cuando se acumula en gran concentración en el suelo el BA funciona como un aleloquímico (Kaur *et al.*, 2005). Es igualmente un mediador de respuestas al

and secondary metabolites (Qualley *et al.*, 2012). It also participates in the internal signals that regulate the defense response of plants against various biotic and abiotic conditions (Williams *et al.*, 2003; Senaratna *et al.*, 2003). Its salts and esters are known as benzoates.

BA and its derivatives are structural elements in many metabolites and natural products performing critical functions in plants as growth regulators, defense compounds and pollinator attractants (Qualley *et al.*, 2012). Moreover, in industrial processes they are widely used as flavor enhancers and preservatives, analgesics, antiseptics and chemotherapeutics (Quan *et al.*, 1996; Chipley, 2005). Despite its simple structure and wide distribution, the understanding of the biochemical pathways leading to the formation of BA remains incomplete. Therefore, knowledge of biosynthesis and BA modification in plants is a crucial step to understand the regulation and functioning of this molecule. So the main objective of this paper is to present the progress reported in scientific literature on this compound, its biosynthesis, modification and function. Also, a second objective is to compare the work done using this compound with that reported for salicylic acid (SA), an analogous compound found in the phenylpropanoids pathway.

Benzoic acid

BA (C_6H_5COOH) is an aromatic carboxylic acid having a carboxyl group bound to a phenyl ring (Figure 1). It was discovered in the sixteenth century in benzoin gum (resin extracted from the bark of several species of trees of the genus *Styrax*) (Neumüller, 1988). It is naturally produced as their esters do in many animal and plant species, reported in vegetables for fruits and berries (Zuo *et al.*, 2002).

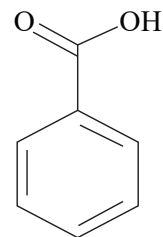


Figura 1. Estructura química del ácido benzoico. Modificado de: Franck *et al.* (2013).

Figure 1. Chemical structure of benzoic acid. Modified from Franck *et al.* (2013).

In plants, BA seems to play an important role in metabolism by regulating growth and chemical modification of the rhizosphere part of root exudates (Elliott and Cheng, 1987)

estrés (Wildermuth, 2006), al incorporarse en numerosos metabolitos secundarios asociados con interacciones planta-herbívoro o planta-patógeno tales como: ésteres de glucosinolatos en *Arabidopsis thaliana* (Graser *et al.*, 2001); salicina, principal glucósido fenólico en sauce (*Salix*) (Ruuhola and Julkunen-Titto, 2003); xantonas en *Hypericum androsaemum* (Abd El-Mawla and Beerhues, 2002); cocaína en *Erythroxylum coca* (Bjorklund and Leete, 1992) y taxol en *Taxus cuspidate* (Walker and Croteau, 2000). Muchos de estos compuestos también son importantes agentes farmacológicos (Figura 2).

Vía biosintética del BA en plantas

A pesar de la importancia de los benzoatos en las plantas el mecanismo para su biosíntesis no ha sido totalmente dilucidado (Qualley *et al.*, 2012). Es probable que existan varias vías biosintéticas del BA en una especie determinada (Wildermuth, 2006), proporcionando un control espacial y temporal sobre la síntesis del mismo, así como sobre la disponibilidad de intermediarios para la fabricación de derivados de los benzoatos.

La evidencia actual sugiere que el BA en las plantas, es sintetizado a partir de la fenilalanina (Phe) o directamente a partir de un producto derivado del shiquimato, posiblemente el isocorismato (Wildermuth, 2006), en el que el carbono carbonilo del shiquimato se retiene en el BA. Sin embargo, se han identificado pocos genes en estas vías metabólicas (Klempien *et al.*, 2012). Los primeros estudios apoyaron la síntesis del BA a partir de la Phe, por lo tanto, la mayoría del trabajo se ha centrado en la vía de derivados de esta. Solo algunos de los genes de plantas que codifican las enzimas de estas vías se han clonado; por ello, queda mucho por hacer para validar, definir y refinar en cuanto a las vías biosintéticas del BA (Wildermuth, 2006).

Biosíntesis del BA a partir de la vía shiquimato/corismato

El término vía directa shiquimato/corismato se utiliza para considerar la posibilidad de que otros intermediarios (por ejemplo shiquimato-3-fosfato o antranilato), además de isocorismato, puedan ser utilizados para la biosíntesis del BA (Wildermuth, 2006) (Figura 3). La interconversión de los productos del BA (por ejemplo SA, ácido 2,3 dihidroxibenzoico (DHBA), ácido 3-hidroxibenzoico (3HBA) y BA) podría ocurrir entonces mediante BA libre o activado, por ejemplo, a través de los conjugado benzoil-Coenzima A (CoA) o BA -glucosa.

that increase the capture capacity of minerals (Maffei *et al.*, 1999); when it accumulates in high concentration in the soil it acts as an allelochemical (Kaur *et al.*, 2005). It is also a mediator of stress responses (Wildermuth, 2006), by incorporating into numerous secondary metabolites associated with plant-herbivore or plant-pathogen interactions such as: glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana* (Graser *et al.*, 2001); salicin, major phenolic glycoside in willow (*Salix*) (Ruuhola and Julkunen-Titto, 2003); xanthones in *Hypericum androsaemum* (Abd El-Mawla and Beerhues, 2002); cocaine in *Erythroxylum coca* (Bjorklund and Leete, 1992) and taxol in *Taxus cuspidate* (Walker and Croteau, 2000). Many of these compounds are also important pharmacological agents (Figure 2).

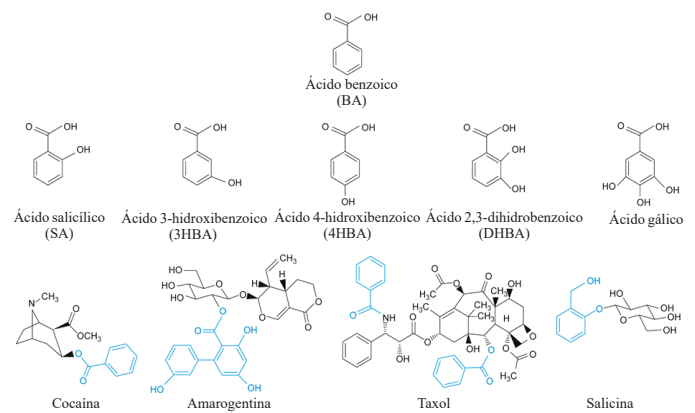


Figura 2. BA y compuestos secundarios en las plantas que se incorporan o se biosintetizan a partir de un radical benzoilo (en azul), el cual es el grupo acilo del BA con estructura C_6H_5CO- . Modificado de: Wildermuth, 2006.

Figure 2. BA and secondary compounds in plants that are incorporated or are biosynthesized from a benzoyl radical (in blue), which is the acyl group from BA with C_6H_5CO- structure. Modified from: Wildermuth (2006).

BA biosynthetic pathway in plants

Despite the importance of benzoates in plants, the mechanism for its biosynthesis has not been fully elucidated (Qualley *et al.*, 2012). There are probably several biosynthetic pathways of BA in a given species (Wildermuth, 2006), providing spatial and temporal control over the synthesis thereof, as well as availability of intermediates for the manufacture of benzoates derivatives.

Current evidence suggests that BA in plants is synthesized from phenylalanine (Phe) or directly from a derived product of shikimate, possibly isochorismate (Wildermuth, 2006),

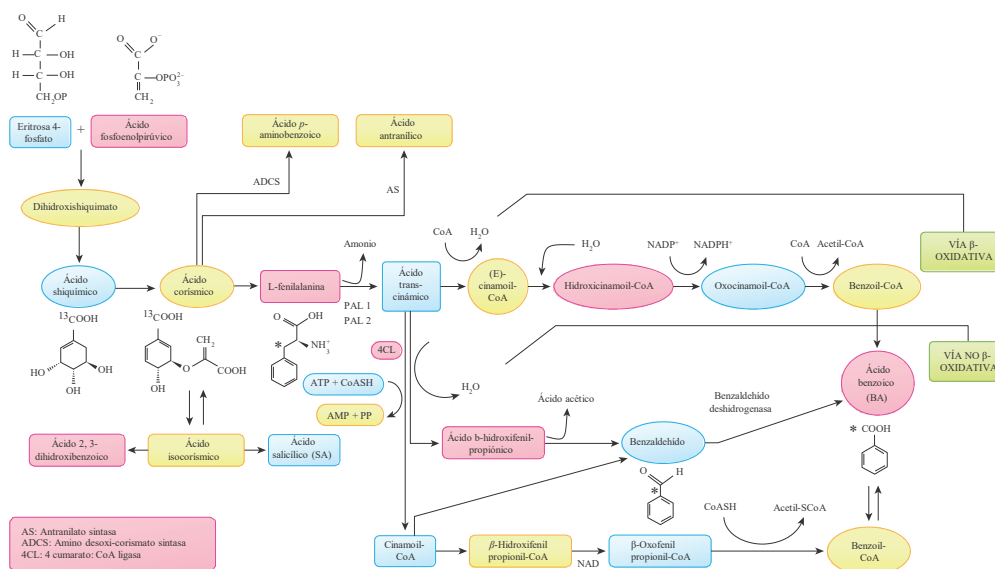


Figura 3. Biosíntesis del BA en las plantas por la vía directa del shiquimato/corismato a través de la fenilalanina. Modificado de: (Wildermuth, 2006; Ashraf *et al.*, 2010; Vogt, 2010; Qualley *et al.*, 2012).

Figure 3. BA biosynthesis in plants by direct route of shikimate/chorismate through phenylalanine. Modified: (Wildermuth, 2006; Ashraf *et al.*, 2010; Vogt, 2010; Qualley *et al.*, 2012).

En *A. thaliana*, la mayor parte del SA que se produce en respuesta a agentes patógenos se sintetiza a partir de isocorismato y no de la Phe, como se confirma por la falta de acumulación de SA inducido en mutantes de la isocorismato sintasa (ICS) (Wildermuth *et al.*, 2001). Este estudio proporcionó asimismo la primera evidencia genética de una vía directa shiquimato/corismato para la síntesis de BA en las plantas. Estudios adicionales que apoyan esta hipótesis, pero que no proporcionan una evidencia directa de esta vía, incluyen: primero, la correlación de acumulación de DHBA con actividad ICS en cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Van Tegelen *et al.*, 1999) y segundo, la incorporación de 3HBA radiomarcado en el radical benzoilo de xantonas junto con la falta de inducción de fenilalanina amonio liasa (PAL) en células de *Centaureum erythraea* (Abd El-Mawla *et al.*, 2001).

En las plantas, la evidencia de la vía shiquimato/corismato en la síntesis del BA incluye dos estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) en la que el ¹³C marcado del carbono carbonilo, es compatible directamente con la síntesis de shiquimato/corismato para el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) en *Rhus typina* (Werner *et al.*, 1997) y 3HBA que se incorpora en la amarogencina en *Swertia chirata* (Wang *et al.*, 2001). Los estudios de NMR utilizando sustratos marcados tales como glucosa y shiquimato, proporcionan un enfoque imparcial y fisiológicamente relevante para la elucidación de la biosíntesis del BA en diferentes condiciones.

in which carbonyl carbon of shikimate is retained in BA. However, few genes have been identified in these metabolic pathways (Klempien *et al.*, 2012). Early studies supported BA synthesis from Phe, therefore, most works have focused on the derivatives of this pathway. Only some of the plant genes encoding enzymes of these pathways have been cloned; therefore there is a lot to be done to validate, define and refine as to the biosynthetic pathways of BA (Wildermuth, 2006).

BA biosynthesis from shikimate/chorismate pathway

The term direct pathway shikimate/chorismate is used to consider the possibility that other intermediaries (e.g. shikimate-3-phosphate or anthranilate), plus isochorismate, can be used for BA biosynthesis (Wildermuth, 2006) (Figure 3). Interconversion of BA products (e.g. SA, 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3-hydroxybenzoic acid (3HBA) and BA) may then occur through free or activated BA, for example, through the conjugate benzoyl-coenzyme A (CoA) or BA-glucose.

In *A. thaliana*, most of SA that is produced as response to pathogen agents is synthesized from isochorismate and not from Phe, as confirmed by the lack of SA accumulation induced in isochorismate synthase (ICS) mutants (Wildermuth *et al.*, 2001). This study also provided the first genetic evidence of a direct shikimate/chorismate

Recientemente se encontró que de forma similar a las bacterias, las plantas también producen SA (Wildermuth *et al.*, 2001) y DHBA (Muljono *et al.*, 2002) a partir de isocorismato, sin embargo no ha habido ninguna evidencia que apoye la producción de exudados radicales que incorporen SA o DHBA (Strawn *et al.*, 2007). Aunque la síntesis y regulación de las vías bacterianas de isocorismato han sido investigadas, hay un conocimiento limitado acerca la ICS y otras enzimas involucradas en estas vías metabólicas, sus productos y sus funciones en las plantas (Strawn *et al.*, 2007). En las bacterias, las enzimas ICS se han asociado con la síntesis de sideróforos para el transporte de Fe^{+3} o menaquinonas que funcionan como aceptores de electrones. Los pasos iniciales para la producción de sideróforos bacterianos de isocorismato implican la síntesis de SA o DHBA; estos compuestos se incorporan en sideróforos, tales como piochelina en *Pseudomonas aeruginosa* (Serino *et al.*, 1995) y enterobactina en *E. coli* (Gehring *et al.*, 1997). En *P. aeruginosa*, la ICS e isocorismato piruvato liasa son necesarias para la síntesis de SA a partir de corismato (Gaille *et al.*, 2002).

Por otra parte, se cree que las plantas son capaces de producir compuestos esenciales derivados de isocorismato, similares a la menaquinona bacteriana a través de *ortho* benzoato de succinil y 1,4-dihidroxi-2 naftoato de metilo (Dosselaere and Vanderleyden, 2001).

Biosíntesis del BA a partir de la Phe

En las plantas, la biosíntesis inicia con la desaminación de la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico (CA) por la acción de la enzima PAL (Coquoz *et al.*, 1998). Se cree que el BA es sintetizado a partir de Phe, a través de la reducción de la cadena lateral de propilo por dos carbonos (Orlova *et al.*, 2006). Se ha reportado, que esta reducción puede ocurrir mediante una vía β -oxidativa (Hertweck *et al.*, 2001) o una vía no β -oxidativa con benzoil-CoA y benzaldehído como precursores para BA, respectivamente. Mientras que la vía β -oxidativa necesita la activación de CoA, la vía no β -oxidativa se produce tanto dependiente de CoA (Boatright *et al.*, 2004), como independiente de la misma (Long *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2009) (Figura 3). La ruta β -oxidativa propuesta, es análoga a la que funciona en el catabolismo de ácidos grasos y de ciertos aminoácidos de cadena ramificada en los peroxisomas de plantas (Hertweck *et al.*, 2001; Wildermuth, 2006).

La formación de benzoato de feniletilo y benzoato de bencilo se produce en el citosol (Boatright *et al.*, 2004), pero requiere BA-CoA producido a través de la vía β -oxidativa en los

route to BA synthesis in plants. Additional studies support this hypothesis, but does not provide direct evidence of this pathway, include: first, accumulation correlation of DHBA with ICS activity in cell cultures of *Catharanthus roseus* (Van Tegelen *et al.*, 1999) and second, incorporation of 3HBA radiolabelled in the xanthone benzoyl radical along with lack of phenylalanine ammonia lyase (PAL) induction in cells from *Centaurium erythraea* (Abd El-Mawla *et al.*, 2001).

In plants, the evidence of shikimate/chorismate pathway in the synthesis of BA includes two studies of nuclear magnetic resonance (NMR) in which ^{13}C labeled from carbonyl carbon is directly compatible with the synthesis of shikimate/chorismate for gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) in *Rhus typhina* (Werner *et al.*, 1997) and 3HBA which incorporates in amarogentin in *Swertia chirata* (Wang *et al.*, 2001). NMR studies using labeled substrates such as glucose and shikimate provide a fair and physiologically relevant approach to elucidate BA biosynthesis under different conditions.

Recently it was found that in a similar way to bacteria, plants also produce SA (Wildermuth *et al.*, 2001) and DHBA (Muljono *et al.*, 2002) from isochorismate, however there has been no evidence supporting the production of root exudates incorporating SA or DHBA (Strawn *et al.*, 2007). Although the synthesis and regulation of bacterial isochorismate pathways have been investigated, there is limited knowledge about ICS and other enzymes involved in these metabolic pathways, their products and their functions in plants (Strawn *et al.*, 2007). In bacteria, ICS enzymes have been associated with the synthesis of siderophores to transport Fe^{+3} or menaquinones that function as electron acceptors. The initial steps for the production of bacterial siderophores from isochorismate involve SA or DHBA synthesis; these compounds are incorporated into siderophores, such as piochelina in *Pseudomonas aeruginosa* (Serino *et al.*, 1995) and enterobactin in *E. coli* (Gehring *et al.*, 1997). In *P. aeruginosa*, the ICS and pyruvate lyase isochorismate are necessary for the synthesis of SA from chorismate (Gaille *et al.*, 2002).

Moreover, it is believed that plants are able to produce essential compounds derivative from isochorismate, similar to bacterial menaquinone through succinyl *ortho* benzoate and methyl 1,4-dihidroxi-2 naphthoate (Dosselaere and Vanderleyden, 2001).

peroxisomas (Van Moerkercke *et al.*, 2009; Klempien *et al.*, 2012). El benzoato de bencilo se utiliza como un acaricida y escabicida, en los hospitales veterinarios (Jamaluddin, 2005).

Los experimentos con precursores marcados con isótopos estables en hojas de tabaco sugieren que el BA, se produce a partir de Phe derivada de CA a través de la vía β -oxidativa, produciendo benzoil-CoA, que puede ser hidrolizado por una tioesterasa a BA libre (Ribnicky *et al.*, 1998). Por el contrario, en cultivos celulares en *Hypericum androsaemum* (Abd El-Mawla and Beerhues, 2002) los experimentos con precursores marcados, junto a la caracterización inicial de la enzima, apoyaron la existencia de la conversión no oxidativa de CA a benzaldehído con la posterior formación de BA, que se puede convertir adicionalmente a benzoil-CoA (Beuerle and Pichersky, 2002).

El mayor progreso en la elucidación de la vía β -oxidativa se ha realizado utilizando *Petunia hybrida*, cuyas flores son ricas en compuestos bencenoides y fenilpropanoides (Qualley *et al.*, 2012). Las actividades enzimáticas de las otras dos vías, es decir, la no oxidativa y la combinación de ambas, hasta el momento no han sido completamente dilucidadas, si bien muchos experimentos de marcado con precursores, han sugerido su presencia en plantas (Orlova *et al.*, 2006).

Modificaciones del BA en plantas

Las modificaciones (metilación, glicosilación, conjugación de aminoácidos y activación con CoA) en las moléculas del BA influyen en su volatilidad, permeabilidad en los diferentes compartimientos celulares, solubilidad y actividad, siendo también cruciales para su transporte y función. En los últimos años se ha avanzado en la identificación de los genes y enzimas que están implicadas en la modificación de la molécula del BA en las plantas. Algunas de estas enzimas también son capaces de utilizar SA u otras moléculas estructuralmente relacionadas (Wildermuth, 2006).

Metilación

La BA metiltransferasa carboxilo cataliza la transferencia del grupo metilo del S- adenosil-L-metionina (SAM) al carboxilo libre del BA, formando ésteres metílicos volátiles como benzoato de metilo y salicilato de metilo. Estos ésteres metílicos son componentes importantes de muchos aromas florales de las plantas. Las primeras BA metiltransferasas carboxilo fueron identificadas y aisladas a partir de tejido

BA biosynthesis from Phe

In plants, the biosynthesis starts with the deamination of L-phenylalanine to trans-cinnamic acid (CA) by the action of PAL enzyme (Coquoz *et al.*, 1998). It is believed that BA is synthesized from Phe, through the reduction of the propyl side chain by two carbons (Orlova *et al.*, 2006). It has been reported that this reduction can occur by a β -oxidative pathway (Hertweck *et al.*, 2001) or a not β -oxidative pathway with benzaldehyde and benzoyl-CoA as precursors for BA, respectively. While the β -oxidative pathway requires activation from CoA, the no β -oxidative pathway occur both dependent (Boatright *et al.*, 2004) and independent from CoA (Long *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2009) (Figure 3). The β -oxidation pathway proposal is analogous to that working in the catabolism of fatty acids and certain branched chain amino acids in plants peroxisomes (Hertweck *et al.*, 2001; Wildermuth, 2006).

The formation of phenylethyl benzoate and benzyl benzoate occurs in cytosol (Boatright *et al.*, 2004), but requires BA-CoA produced through β -oxidative pathway in the peroxisomes (Moerkercke Van *et al.*, 2009; Klempien *et al.*, 2012). Benzyl benzoate is used as an acaricide and scabicide in veterinary hospitals (Jamaluddin, 2005).

Experiments with stable isotope labeled precursors in tobacco leaves suggests that BA, is produced from Phe derived from CA through β -oxidative pathway, producing benzoyl-CoA which can be hydrolyzed by a thioesterase to free BA (Ribnicky *et al.*, 1998). By contrast, in cell cultures of *Hypericum androsaemum* (Abd El-Mawla and Beerhues, 2002) the experiments with labeled precursors, with the initial characterization of the enzyme, supported the existence of non-oxidative conversion of CA to benzaldehyde with subsequent BA formation, which can be converted to benzoyl-CoA (Beuerle and Pichersky, 2002).

The greatest progress in the elucidation of the β -oxidative pathway has been performed using *Petunia hybrida*, whose flowers are rich in benzenoid and phenylpropanoids compounds (Qualley *et al.*, 2012). The enzymatic activities of the other two routes, i.e., the non-oxidative and the combination thereof, have so far not been fully elucidated, but many experiments with labeled precursors, have suggested their presence in plants (Orlova *et al.*, 2006).

floral (Effmert *et al.*, 2005). Se ha indicado que las BA metiltransferasas carboxilo tienen un papel en la defensa contra el estrés biótico y abiótico (Chen *et al.*, 2003).

Glicosilación

Las UDP-glucosiltransferasas (UGT's) catalizan la transferencia de glucosa al carboxilo del BA, formando un éster de glucosa de benzoilo (BAE) en tabaco (Lee and Raskin, 1999) y en *A. thaliana* (Lim *et al.*, 2002) *in vitro*. Estas enzimas también pueden glicosilar moléculas estructuralmente relacionadas, como SA, formando éster de glucosa salicílico (SAE) o 2-O- β -D glucósido (SAG) (Lim *et al.*, 2002). La glicosilación altera la hidrofiliidad, estabilidad y localización subcelular de la molécula receptora, modificando por lo tanto su bioactividad (Bowles *et al.*, 2005). La glicosilación puede desempeñar un papel en la homeostasis y la utilización del BA en las plantas, a través de la interconversión controlada de los ácidos y ésteres de glucosa/glucósidos. Además, los compuestos glicosilados también pueden servir como intermediarios en la biosíntesis del BA en las plantas. El éster CA-glucosa se ha propuesto como un paso intermedio en la formación de BAE y BA en tabaco (Chong *et al.*, 2001).

Conjugación de aminoácidos

La conjugación de una hormona vegetal con los aminoácidos puede activarla (por ejemplo, ácido jasmónico) (Staswick and Tiryaki, 2004) o inactivarla (por ejemplo, ácido indol acético, IAA) (Woodward and Bartel, 2005). Las enzimas que catalizan la formación de estos conjugados de fitohormonas unidos a amidas son proteínas denominadas GH-3 (Staswick *et al.*, 2002). En *A. thaliana* se han identificado amido hidrolasas que catalizan la conjugación de IAA-aminoácidos, sin embargo, aún no se han identificado sintetasas de aminoácidos o amidohidrolasas específicas del BA; a pesar de lo anterior, es posible que los conjugados de aminoácidos desempeñen un papel en el control temporal y espacial de los benzoatos libres (Wildermuth, 2006).

Activación con CoA

La incorporación de un radical benzoilo en metabolitos secundarios se produce por la transferencia de un BA intermedio activado, como benzoil-CoA, a través de una aciltransferasa. Se han aislado y caracterizado benzoato-CoA ligasas en microorganismos degradadores de benzoato (López-Barragán *et al.*, 2004). En las plantas la caracterización de benzoato-CoA ligasas es más reciente

BA modifications in plants

Modifications (methylation, glycosylation, amino acid conjugation and activation with CoA) in BA molecules influence in the volatility, permeability in different cellular compartments, solubility and activity, being also crucial for its transport and function. In recent years progress has been made in identifying genes and enzymes that are involved in modifying BA molecule in plants. Some of these enzymes are also able to use SA or other structurally related molecules (Wildermuth, 2006).

Methylation

BA carboxyl methyltransferase catalyzes the transfer of the methyl group from S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the free carboxyl of BA, forming volatile methyl esters as methyl benzoate and methyl salicylate. These methyl esters are important components of many floral aromas of plants. The first BA carboxyl methyltransferases were identified and isolated from floral tissue (Effmert *et al.*, 2005). It has been indicated that BA carboxyl methyltransferases have a role in defense against biotic and abiotic stresses (Chen *et al.*, 2003).

Glycosylation

UDP-glycosyltransferases (UGT's) catalyze the transfer of glucose to BA carboxyl, forming a benzoyl ester of glucose (BAE) in tobacco (Lee and Raskin, 1999) and *in vitro* of *A. thaliana* (Lim *et al.*, 2002). These enzymes can also glycosylate structurally related molecules, like SA, forming glucose salicylic ester (SAE) or 2-O- β -D glucoside (SAG) (Lim *et al.*, 2002). Glycosylation alters hydrophilicity, stability and subcellular localization of the receptor molecule, thereby modifying its bioactivity (Bowles *et al.*, 2005). Glycosylation can play a role in homeostasis and BA utilization in plants through controlled interconversion of acids and glucose/glucoside esters. In addition, glycosylated compounds can also serve as intermediates in BA biosynthesis of plants. The CA-glucose ester has been proposed as an intermediate step in the formation of BAE and BA in tobacco (Chong *et al.*, 2001).

Amino acid conjugation

Conjugation of plant hormone with amino acids can activate it (for example, jasmonic acid) (Staswick and Tiryaki, 2004) or inactivate it (e.g. indoleacetic acid, IAA) (Woodward and

(Wildermuth, 2006). Una 3HBA: CoA ligasa se aisló y caracterizo a partir de *Centaruium erythrae* (Barillas and Beerhues, 2000). Por otro lado, una BA: CoA ligasa fue purificada y caracterizada a partir de *Clarkia breweri* (Beuerle and Pichersky, 2002). La acción de estas enzimas podría facilitar la canalización específica de benzoil-CoA a la aciltransferasa adecuada para la adición del radical benzoilo para un metabolito secundario dado.

Funciones del BA y efectos reportados de su aplicación exógena en plantas

El BA ejerce efectos positivos en las plantas bajo condiciones de crecimiento alejadas del óptimo. El Cuadro 1 muestra un resumen de trabajos aplicando BA, SA y sus derivados (compuestos asociados a la vía de los fenilpropanoides). En todos ellos parecen jugar un papel importante los salicilatos, los cuales aparentemente regulan la inducción selectiva de las diferentes vías de resistencia (Maleck and Dietrich, 1999).

Cuadro 1. Resumen de los resultados de trabajos realizados utilizando BA, SA y derivados.

Table 1. Summary of results from works performed using BA, SA and derivatives.

Especie	Compuesto aplicado	Resultado	Referencia
Soya	SA	Aumenta la biomasa de brotes y raíces.	Gutiérrez-Coronado <i>et al.</i> (1998).
Tomate y frijol	BA	Modifica el crecimiento y la tolerancia al estrés.	Senaratna <i>et al.</i> (2003).
Chile serrano	SA y sulfosalicílico	Mayor tolerancia a baja temperatura.	Benavides-Mendoza <i>et al.</i> (2004).
Melón	SA y BA	Mayor diámetro de tallo y longitud de guía.	Benavides-Mendoza, (2004).
Papa	SA y BA	El BA aplicado en tubérculo indujo mayor peso fresco y seco aéreo y de raíz.	Benavides-Mendoza, (2004).
Lechuga y betabel	SA y BA	Mejor germinación y mayor crecimiento de plántula.	Benavides-Mendoza, (2004).
Tomate	BA	Efecto positivo sobre el crecimiento y la producción del fruto.	Benavides-Mendoza <i>et al.</i> (2007).
Chile piquín	BA	Aumenta la producción de frutos y afecta positivamente el contenido de antioxidantes.	Sandoval-Rangel <i>et al.</i> (2011).
Soya	BA	Mejora el intercambio de gases, contenido de clorofila, crecimiento y rendimiento.	Anjum <i>et al.</i> (2013).

El BA aplicado en plantas superiores modifica el perfil de los nutrientes minerales acumulados en los tejidos, y el crecimiento y la anatomía y morfología de especies comestibles y ornamentales. Del mismo modo, el SA mejora la absorción y transporte de nutrientes, incrementa la actividad de enzimas antioxidantes, provoca cambios en la anatomía de las plantas e incrementa el rendimiento (Khan *et al.*, 2010; Purcărea and Cachiñã-Cosma, 2010).

Bartel, 2005). Enzymes that catalyze the formation of these phytohormone conjugates attached to amides are proteins called GH-3 (Staswick *et al.*, 2002). In *A. thaliana* have been identified amido hydrolases that catalyze the conjugation of IAA-amino acids, however, yet it have not been identified synthetases of amino acids or specific amidohydrolases from BA; despite this, it is possible that amino acid conjugates play a role in the temporal and spatial control of free benzoates (Wildermuth, 2006).

Activation with CoA

Incorporating a benzoyl radical in secondary metabolites it is produced by transference of an intermediate BA activated as benzoyl-CoA via an acyltransferase. Benzoate-CoA ligase have been isolated and characterized in microorganism breaking down benzoate (Lopez-Barragan *et al.*, 2004). In plants characterization of benzoate-CoA ligase is more recent (Wildermuth, 2006).

A 3HBA: CoA ligase was isolated and characterized from *Centaruium Erythrae* (Barillas and Beerhues, 2000). On the other hand, a BA: CoA ligase was purified and characterized from *Clarkia breweri* (Beuerle and Pichersky, 2002). The action of these enzymes may facilitate specific targeting of benzoyl-CoA to a suitable acyltransferase for the addition of a benzoyl radical as a secondary metabolite.

Por otro lado, se ha reportado que las plantas acumulan BA en el suelo, en donde funciona como un aleloquímico (Kaur *et al.*, 2005); es decir, como un compuesto emitido al medio por las plantas y que interfiere con el crecimiento de organismos competidores. De manera similar se ha reportado que el SA funciona como compuesto alelopático y termogénico (Raskin, 1992).

Se ha documentado que el BA ejerce efectos positivos en las plantas bajo condiciones de crecimiento alejadas del óptimo, ya que induce tolerancia al estrés abiótico (Senaratna *et al.*, 2003). Mientras tanto, se menciona que las aplicaciones de SA afectan positivamente varios procesos fisiológicos, entre los cuales destacan los relacionados con plantas bajo condiciones de estrés, como déficit de agua (Singh and Usha, 2003; Horváth *et al.*, 2007), fitotoxicidad (Metwally *et al.*, 2003) y bajas temperaturas (Farooq *et al.*, 2008).

Entre otros reportes se menciona que el BA, mejora la germinación en medios salinos (Benavides-Mendoza, 2004) y permite un mejor crecimiento y productividad de plantas de tomate que crecen en suelos calcáreos (Benavides-Mendoza *et al.*, 2007). Por su parte, se ha reportado que el SA incrementa la actividad enzimática catalasa y peroxidasa en tomate (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007).

Finalmente, se ha descubierto que el SA endógeno está involucrado en las respuestas fisiológicas a patógenos, área en donde se ha desarrollado gran cantidad de información referente a su producción endógena a nivel celular en la llamada resistencia sistémica adquirida (Maksimov and Yarullina, 2007). Hasta donde se sabe Williams *et al.* (2003), reportaron el primer informe de la resistencia inducida a un patógeno por una aplicación exógena de BA. Los mismos autores indican la posibilidad de que el BA sea el grupo común, encontrado en el ácido salicílico, sulfosalicílico y metil salicílico, responsable de las propiedades de inducción de tolerancia al estrés en estudios previos (Senaratna *et al.*, 2003).

Conclusiones

La perspectiva expuesta en esta revisión muestra los avances obtenidos en relación al papel que desempeña el BA en las actividades fisiológicas de las plantas. Los pocos estudios realizados apoyan la idea de que el BA se sintetiza tanto directamente desde shiquimato/corismato y de Phe en la mayoría de las plantas. La complejidad

BA functions and reported effects of their exogenous application to plants

BA has positive effects on plants under growing conditions far from optimal. Table 1 shows a summary of works using BA, SA and their derivatives (compounds associated with the phenylpropanoids pathway). Salicylates seem to play an important role in all of them, which apparently regulate the selective induction of different pathways to resistance (Maleck and Dietrich, 1999).

The BA applied in higher plants modifies the profile of mineral nutrients accumulated in tissues, and growth and morphology and anatomy of edible and ornamental species. Similarly, SA improves nutrient absorption and transportation, increases the activity of antioxidant enzymes, causes changes in the anatomy of plants and increases yield (Khan *et al.*, 2010; Purcărea and Cachiță-Cosma, 2010).

Furthermore, it has been reported that plants accumulate BA on the soil, acting as an allelochemical (Kaur *et al.*, 2005); that is, as a compound released into the environment by the plants which interferes with the growth of competing organisms. Similarly it has been reported that the SA works as an allelopathic and thermogenic compound (Raskin, 1992).

It has been documented that BA has positive effects on plant growth under conditions far from optimal, since it induces tolerance to abiotic stress (Senaratna *et al.*, 2003). Meanwhile, it is mentioned that application of SA positively affect several physiological processes, among which are those related to plants under stress conditions, such as water stress (Singh and Usha, 2003; Horvath *et al.*, 2007), phytotoxicity (Metwally *et al.*, 2003) and low temperatures (Farooq *et al.*, 2008).

Other reports mention that BA enhances germination under saline conditions (Benavides-Mendoza, 2004) and allows a better growth and productivity of tomato plants growing in calcareous soils (Benavides-Mendoza *et al.*, 2007). Meanwhile, it has been reported that SA increases the catalase and peroxidase enzyme activity in tomato (Ortega-Ortiz *et al.*, 2007).

Finally, it has been found that endogenous SA is involved in the physiological response to pathogens, area where most information has been developed concerning its endogenous production at cellular level called systemic acquired

observada, probablemente se deba a la simplicidad de estas moléculas y su evolución química. Es necesario realizar más investigación, utilizando mayor cantidad de especies vegetales, para determinar en qué tejidos y en qué condiciones se utilizan estas distintas vías. Por último, los reportes indican que la aplicación exógena de esta sustancia, modifica el crecimiento, la tolerancia al estrés y la anatomía y morfología de especies comestibles y ornamentales.

Literatura citada

- AbdEl-Mawla, A. M.; Schmidt, W. and Beerhues, L. 2001. Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN. *Planta*. 212(2):288-293.
- AbdEl-Mawla, A. M. and Beerhues, L. 2002. Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta*. 214(5):727-733.
- Anjum, S. A.; Xue, L.; Wang, L.; Saleem, M. F. and Huang, C. 2013. Exogenous benzoic acid (BZA) treatment can induce drought tolerance in soybean plants by improving gas-exchange and chlorophyll contents. *Australian J. Crop Sci.* 7(5):555-560.
- Ashraf, M.; Akram, N. A.; Arteca, R. N. and Foolad, M. R. 2010. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29(3):162-190.
- Barillas, W. and Beerhues, L. 2000. 3-Hydroxybenzoate: coenzyme A ligase from cell cultures of *Centaureum erythraea*: isolation and characterization. *Biol. Chem.* 381(2):155-160.
- Benavides-Mendoza, A. 2004. Estrategias para el uso de los mecanismos naturales de tolerancia al estrés en plantas. *In: tópicos selectos de botánica*. Foroughbakhch, P. R.; Torres-Cepeda, T. E. y Alvarado-Vázquez, M. A. (Eds.). Primera edición. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N. L. México. 163-172 pp.
- Benavides-Mendoza, A.; Burgos-Limón, D.; Ortega-Ortiz, H. y Ramírez, H. 2007. El ácido benzoico y poliácido acrílico-quitosán en la calidad y rendimiento del tomate cultivado en suelo calcáreo. *Terra Latinoam.* 25(3):261-268.
- Benavides-Mendoza, A.; Salazar-Torres, A. M.; Ramírez-Godina, F.; Robledo-Torres, V.; Ramírez-Rodríguez, H. y Maiti, R. 2004. Tratamiento de semilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. *Terra Latinoam.* 22(1):41-47.
- Beuerle, T. and Pichersky, E. 2002. Purification and characterization of benzoate: coenzyme A ligase from *Clarkia breweri*. *Arch. Biochem. Biophys.* 400(2):258-264.
- Bjorklund, J. A. and Leete, E. 1992. Biosynthesis of the benzoyl moiety of cocaine from cinnamic acid via (R)-(+)-3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid. *Phytochemistry*. 31(11):3883-3887.
- Boatright, J.; Negre, F.; Chen, X.; Kish, C. M.; Wood, B.; Peel, G.; Orlova, I.; Gang, D.; Rhodes, D. and Dudareva, N. 2004. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.* 135(4):1993-2011.
- resistance (Maksimov and Yarullina, 2007). Williams *et al.* (2003) reported the first report of induced resistance to a pathogen by exogenous application of BA. The authors mention the possibility that BA is the common group, found in the salicylic acid, sulfosalicylic acid and methyl salicylic, responsible for the properties of induction to stress tolerance in previous studies (Senaratna *et al.*, 2003).

Conclusions

The perspective presented in this review shows the progress made in relation to the role that BA develops in physiological activities of the plants. The few studies support the idea that BA is synthesized either directly from shikimate/chorismate or from Phe in most plants. The observed complexity is probably due to the simplicity of these molecules and their chemical evolution. More research is needed, using more plant species to determine in which tissues and under what conditions these pathways are used. Finally, the reports indicate that the exogenous application of this substance modifies growth, stress tolerance and anatomy and morphology of edible and ornamental species.

End of the English version



- Bowles, D.; Isayenkova, J.; Lim, E. K. and Poppenberger, B. 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(3):254-263.
- Chen, F.; D'Auria, J. C.; Tholl, D.; Ross, J. R.; Gershenzon, J.; Noel, J. P. and Pichersky, E. 2003. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J.* 36(5):577-588.
- Chipley, J. 2005. Sodium benzoate and benzoic acid. *In: antimicrobials in foods*. Davidson, P. M.; Sofos, J. N. and Branen, A. L. (Eds.). Third edition. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 11-48 pp.
- Chong, J.; Pierrel, M. A.; Atanassova, R.; Werck-Reichhart, D.; Fritig, B. and Saindrenan, P. 2001. Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol.* 125(1):318-328.
- Coquoz, J. L.; Buchala, A. and Metraux, J. P. 1998. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* 117(3):1095-1101.
- Dosselaere, F. and Vanderleyden, J. 2001. A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 27(2):75-131.
- Effmert, U.; Saschenbrecker, S.; Ross, J.; Negre, F.; Fraser, C. M.; Noel, J. P.; Dudareva, N. and Piechulla, B. 2005. Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from in vitro to in planta function. *Phytochemistry*. 66(11):1211-1230.

- Elliott, L. F. and Cheng, H. H. 1987. Assessment of allelopathy among microbes and plants. *In: Allelochemicals: Role in agriculture and forestry.* Waller, G. R. (Ed.). First edition. ACS. Washington, D.C., USA. 504-515 pp.
- Farooq, M.; Aziz, T.; Basra, S. M. A.; Cheema M. A. and Rehman, H. 2008. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *J. Agron. Crop. Sci.* 194(2):161-168.
- Franck, T.; Mouithys-Mickalad, A.; Robert, T.; Ghitti, G.; Deby-Dupont, G.; Neven, P. and Serteyn, D. 2013. Differentiation between stoichiometric and anticatalytic antioxidant properties of benzoic acid analogues: a structure/redox potential relationship study. *Chem. Biol. Interact.* 206(2):194-203.
- Gaille, C.; Kast, P. and Haas, D. 2002. Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *J. Biol. Chem.* 277(24):21768-21775.
- Gehring, A. M.; Bradley, K. A. and Walsh, C. T. 1997. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry.* 36(28):8495-8503.
- Graser, G.; Oldham, N. J.; Brown, P. D.; Temp, U. and Gershenzon, J. 2001. The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* 57(1):23-32.
- Gutiérrez-Coronado, M. A.; Trejo-López, C. and Larqué-Saavedra, A. 1998. Effect of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36(8):563-565.
- Hertweck, C.; Jarvis, A. P.; Xiang, L.; Moore, B. S. and Oldham, N. J. 2001. A mechanism of benzoic acid biosynthesis in plants and bacteria that mirrors fatty acid β -oxidation. *Chem. Bio. Chem.* 2(10):784-786.
- Horváth, E.; Pál, M.; Szalai, G.; Páldi, E. and Janda T. 2007. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. *Biol. Plant.* 51(3):480-487.
- Jamaluddin, S. 2005. Benzyl benzoate. *In: Encyclopedia of toxicology 1.* Wexler, P. (Ed.). Second edition. Elsevier Inc. Waltham, MA, USA. 264-265 pp.
- Kaur, H.; Inderjit and Kaushik, S. 2005. Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* 43(1):77-81.
- Khan, N.; Syeed, S.; Masood, A.; Nazar, R. and Iqbal, N. 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *Int. J. Plant Biol.* 1:1-9.
- Klempien, A.; Kaminaga, Y.; Qualley, A.; Nagegowda, D. A.; Widhalm, J. R.; Orlova, I.; Shasany, A. K.; Taguchi, G.; Kish, C. M.; Cooper, B. R.; D'auria, J. C.; Rhodes, D.; Pichersky, E. and Dudareva, N. 2012. Contribution of CoAligases to benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell.* 24(5):2015-2030.
- Lee, H. I. and Raskin, I. 1999. Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 274(51):36637-36642.
- Lim, E. K.; Doucet, C. J.; Li, Y.; Elias, L.; Worrall, D.; Spencer, S. P.; Ross, J. and Bowles, D. J. 2002. The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J. Biol. Chem.* 277(1):586-592.
- Long, M. C.; Nagegowda, D. A.; Kaminaga, Y.; Ho, K. K.; Kish, C. M.; Schnepf, J.; Sherman, D.; Weiner, H.; Rhodes, D. and Dudareva, N. 2009. Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *Plant J.* 59(2):256-265.
- López-Barragán, M. J.; Carmona, M.; Zamarro, M. T.; Thiele, B.; Boll, M.; Fuchs, G.; García, J. L. and Díaz, E. 2004. The bzd gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J. Bacteriol.* 186(17):5762-5774.
- Maffei, M.; Berteaux, C. M.; Garneri, F. and Scannerini, S. 1999. Effect of benzoic acid hydroxy- and methoxy- ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I.: Isocitrate lyase and catalase activity. *Plant Sci.* 141(2):139-147.
- Maksimov, I. V. and Yarullina, L. G. 2007. Salicylic acid and local resistance to pathogens. *In: Salicylic acid -A plant hormone.* Hayat, S. and Ahmad, A. (Eds.). First edition. Springer Netherlands. Dordrecht, The Netherlands. 323-334 pp.
- Maleck, K. and Dietrich, R. A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4(6):215-219.
- Metwally, A.; Finkemeier, I.; Georgi, M. and Dietz, K. J. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132(1):272-281.
- Muljono, R. A. B.; Scheffer, J. J. C. and Verpoorte, R. 2002. Isochorismate is an intermediate in 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 40(3):231-234.
- Mustafa, N. R.; Kim, H. K.; Choi, Y. H. and Vepoorte, R. 2009. Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. *Biotechnol. Lett.* 31(12):1967-1974.
- Neumüller, O. A. 1988. *Römpps Chemie-Lexikon.* Franckh'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart. 101(3):365-366.
- Orlova, I.; Marshall-Colón, A.; Schnepf, J.; Wood, B.; Varbanova, M.; Fridman, E.; Blakeslee, J. J.; Peer, W. A.; Murphy, A. S.; Rhodes, D.; Pichersky, E. and Dudareva, N. 2006. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *Plant Cell.* 18(12):3458-3475.
- Ortega-Ortiz, H.; Benavides-Mendoza, A.; Mendoza-Villarreal, R.; Ramírez-Rodríguez, H. and De Alba, R. K. 2007. Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. *J. Mex. Chem. Soc.* 51(3): 141-144.
- Purcărea, C. and Cachiță-Cosma, D. 2010. Studies regarding the effects of salicylic acid on maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress. *Studia Universitatis Vasile Goldiș Seria Științele Vieții.* 20(1):63-68.
- Qualley, A. V.; Widhalm, J. R.; Adebesein, F.; Kish, C. M. and Dudareva, N. 2012. Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(40):16383-16388.
- Quan, C.; Mok, W. M. and Wang, G. K. 1996. Use-dependent inhibition of Na^+ currents by benzocaine homologs. *Biophys. J.* 70(1):194-201.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:439-463.
- Ribnicky, D. M.; Shulaev, V. and Raskin, I. I. 1998. Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 118(2): 565-572.
- Ruuhola, T. and Julkunen-Titto, R. 2003. Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix pentandra*. *J. Chem. Ecol.* 29(7): 1565-1588.

- Sandoval-Rangel, A.; Benavides-Mendoza, A.; Alvarado-Vázquez, M. A.; Foroughbakhch-Pournavab, R.; Núñez-González, M. A. y Robledo-Torres, V. 2011. Influencia de ácidos orgánicos sobre el crecimiento, perfil bromatológico y metabolitos secundarios en chile piquín. *Terra Latinoam.* 29(4):395-401.
- Senaratna, T.; Merritt, D.; Dixon, K.; Bunn, E.; Touchell, D. and Sivasithamparam, K. 2003. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regul.* 39(1):77-81.
- Serino, L.; Reimmann, C.; Baur, H.; Beyeler, M.; Visca, P. and Haas, D. 1995. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 249(2):217-228.
- Singh, B. and Usha, K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regul.* 39(2):137-141.
- Staswick, P. E.; Tiryaki, I. and Rowe, M. L. 2002. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell.* 14(6):1405-1415.
- Staswick, P. E. and Tiryaki, I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16(8):2117-2127.
- Strawn, M. A.; Marr, S. K.; Inoue, K.; Inada, N.; Zubieta, C. and Wildermuth, M. C. 2007. *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J. Biol. Chem.* 282(8):5919-5933.
- Van Moerkercke, A.; Schauvinhold, I.; Pichersky, E.; Haring, M. A. and Schuurink, R. C. 2009. A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *Plant J.* 60(2):292-302.
- Van Tegelen, L. J. P.; Moreno, P. R. H.; Croes, A. F.; Verpoorte, R. and Willems, G. J. 1999. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 119(2):705-712.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* 3(1):2-20.
- Walker, K. and Croteau, R. 2000. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2a-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(25):13591-13596.
- Wang, C. Z.; Maier, U. H.; Eisenreich, W.; Adam, P.; Obersteiner, I.; Keil, M.; Bacher, A. and Zenk, M. H. 2001. Unexpected biosynthetic precursors of amarogentin - Aretrobiosynthetic ¹³C NMR study. *Eur. J. Org. Chem.* 2001(8):1459-1465.
- Werner, I.; Bacher, A. and Eisenreich, W. 1997. Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. *J. Biol. Chem.* 272(41):25474-25482.
- Wildermuth, M. C.; Dewdney, J.; Wu, G. and Ausubel, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414(6863):562-565.
- Wildermuth, M. C. 2006. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(3):288-296.
- Williams, M.; Senaratna, T.; Dixon, K. and Sivasithamparam, K. 2003. Benzoic acid induces tolerance to biotic stress caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Banksia attenuate*. *Plant Growth Regul.* 41(1):89-91.
- Woodward, A. W. and Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95(5):707-735.
- Zuo, Y.; Wang, C. and Zhan, J. 2002. Separation, characterization and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 50(13):3789-3794.