



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Estudio del perfil metabolómico de *Jatropha curcas* bajo estrés biótico y
abiótico”**

TESIS

Que presenta

Gonzalo Guillermo Lucho Constantino

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Directora de Tesis

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Ciudad de México

AGOSTO, 2017

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada con el número de becario 52756 durante el período Agosto 2011- Julio 2014.

A todos los miembros de mi comité tutorial, en especial a la Dra. Ana Ramos Valdivia por su apoyo.

Índice general

Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
1. Introducción	1
1.1 <i>Jatropha curcas</i>	1
1.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i>	6
1.2 Funciones y biosíntesis de flavonoides	7
1.3 El estrés por frío y el osmótico activa la biosíntesis de flavonoides	10
1.4 Estrés por frío y el osmótico inducen cambios en la respuesta antioxidante	12
1.5 Comunicación cruzada durante la señalización del estrés biótico y abiótico	14
1.6 Ácido jasmónico, flavonoides y respuesta antioxidante	17
1.7 Triterpenos, biosíntesis y elicitación	18
2. Justificación	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivo general	22
4.1 Objetivos particulares	22
5. Materiales y Métodos	23
5.1 Cultivo de plantas de <i>J. curcas</i>	23
5.1.1 Germinación y mantenimiento de variedades de <i>J. curcas</i>	23
5.1.2 Tratamiento de plantas con ácido jasmónico	23
5.1.3 Exposición de plantas de <i>J. curcas</i> a una temperatura de 10 °C	24
5.1.3.1 Experimento en hojas de la variedad I-Chiapas con ácido abscísico (ABA) y su exposición a una temperatura de 10 °C.	25
5.1.4 Tratamiento con ácido jasmónico y exposición a temperatura de 5° C a las plantas de <i>J. curcas</i> variedad I-52	25
5.1.5 Tratamiento con ácido jasmónico y sacarosa	26
5.2 Extracción, identificación y cuantificación de metabolitos secundarios	27
5.2.1 Flavonoides	27
5.2.1.1 Extracción por hidrólisis ácida	27

5.2.1.2	Cuantificación por método AlCl_3	28
5.2.1.3	Cuantificación de vitexina, isovitexina, apigenina y kaempferol por HPLC	28
5.2.1.4	Localización <i>in situ</i> de flavonoides	29
5.2.2	Antocianinas	29
5.2.2.1	Extracción y cuantificación	29
5.2.2.2	Extracción por hidrólisis ácida y purificación con columnas C18 para análisis por HPLC	30
5.2.2.3	Identificación de antocianinas por HPLC	31
5.2.3	Triterpenos	32
5.2.3.1	Extracción y cuantificación de lupeol, betulina y ácido betulínico por HPLC	32
5.3	Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)	33
5.3.1	Flavonoides	33
5.3.2	Antocianinas	34
5.3.3	Triterpenos	34
5.4	Extracción y cuantificación de α -tocoferol	35
5.5	Indicadores de respuesta oxidante	36
5.5.1	Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	36
5.5.2	Detección histoquímica de H_2O_2 <i>in situ</i>	36
5.5.3	Determinación de malondialdehído	37
5.6	Respuesta enzimática	37
5.6.1	Extracción y cuantificación de proteína	37
5.6.2	Actividad enzimática de catalasa	38
5.6.3	Actividad enzimática de ascorbato peroxidasa	38
5.6.4	Actividad enzimática de Glutación reductasa	39
5.7	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i>	39
5.7.1	Obtención de cultivo de brotes	40
5.7.2	Obtención de cultivo de callos	40
5.7.3	Obtención de cultivo de células en suspensión de <i>J. curcas</i>	41
5.7.4	Evaluación del cultivo en suspensión de <i>J. curcas</i> bajo el efecto de elicitores abióticos	42
5.8	Análisis estadísticos	42
6.	Resultados y Discusión	43

6.1 Identificación de fenoles y flavonoides en diferentes tejidos de <i>J. curcas</i>	43
6.2 Cambios en los marcadores de estrés oxidativo y en la respuesta antioxidante en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad Chiapas expuestas a un periodo corto de frío (10 °C)	46
6.3 Efecto de la aplicación exógena del AJ en el perfil de flavonoides, contenido de antocianinas y respuesta antioxidante en dos variedades (I-64 e I-52) de plantas de <i>J. curcas</i>	58
6.4 Efecto de la aplicación exógena del AJ en los marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52 expuestas a una baja temperatura (5 °C)	58
6.5 Efecto de la sacarosa y AJ en el contenido de antocianinas, marcadores de estrés y respuesta antioxidante en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52 y I-64	66
6.6 Identificación de lupeol en diferentes tejidos de plantas de <i>J. curcas</i>	75
6.7 Cultivos <i>in vitro</i> : Inducción de brotes, cultivo de callos y células en suspensión	77
6.7.1 Inducción de brotes	77
6.7.2 Cultivo de callos	81
6.7.3 Cultivo de células en suspensión	85
7. Conclusiones	90
8. Bibliografía	91
9. Anexo 1	120
10. Anexo 2	124

Índice de figuras

Figura 1. Ruta de biosíntesis de flavonoides en plantas.	9
Figura 2. Representación de la señalización general del estrés por el frío y el osmótico, involucrando las respuestas al estrés.	14
Figura 3. Representación de la posible comunicación cruzada del ABA-AJ durante el estrés por el frío y el cambio osmótico	16
Figura 4. Representación de las posibles respuestas a la elicitación con metil jasmonato (MJ) y activación de la biosíntesis de fenilpropanoides	18
Figura 5. HPTLC (366 nm) de extractos hidrolizados de diferentes tejidos de <i>J. curcas</i> .	43
Figura 6. Cromatograma del perfil de flavonoides en hojas de <i>J. curcas</i> variedad I-64 obtenido luego de la separación por HPLC, utilizando como fase móvil metanol y 0.1% TFA en agua en un sistema por gradiente de acuerdo a Liu et al., (2010); detectados a 333 nm. Vitexina (1 , $t_R = 17.12$ min), isovitexina (2 , $t_R = 23.71$ min), kaempferol (3 , $t_R = 31.89$ min) y apigenina (4 , $t_R = 32.59$ min).	45
Figura 7. Plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuesta a 10 °C en fotoperiodo (12/12) durante 48 h. A. Síntomas de daño en el área foliar. B. Contenido de MDA.	47
Figura 8. Contenido y detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ en hojas de plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuesta a 10 °C en fotoperiodo (12/12) . A. Cambios del contenido de H ₂ O ₂ durante 48h. B. Detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ en hojas luego de 48 h expuesta a 30 y 10 °C.	50
Figura 9. Concentración de: A. α -tocoferol y B. flavonoides totales (B) en hojas de plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C durante 48 h.	53
Figura 10. Perfil de flavonoides en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C por 48 h. A. HPTLC y B. Nivel relativo de flavonoides en hojas.	55
Figura 11. Detección <i>in situ</i> de H ₂ O ₂ y flavonoides en hojas de plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C y tratadas con 100 μ M de ABA (-, sin ABA; +, con ABA). A. H ₂ O ₂ <i>in situ</i> . B. Fluorescencia de flavonoides. C. Porcentaje del área de acumulación de H ₂ O ₂ y D. Porcentaje de intensidad de fluorescencia de flavonoides.	57
Figura 12. Plantas de <i>J. curcas</i> variedad I-52 expuestas a 5 °C por 48 h en oscuridad A. Síntoma de daño en la hoja y B. contenido de MDA.	59
Figura 13. Contenido de MDA en plantas pretratadas con diferentes concentraciones de AJ en <i>J. curcas</i> , variedad I-52 expuestas a 5 °C por 48 h en oscuridad.	61
Figura 14. Concentración de H ₂ O ₂ después de 48 h de tratamiento con AJ	61

1 mM y frío (5 °C) en plantas de *J. curcas*, variedad I-52.

- Figura 15.** Contenido de antocianinas en plantas de *J. curcas*, variedad I-52 e I-64 después de 5 d de tratamiento con diferentes concentraciones de sacarosa. 67
- Figura 16.** Concentración de: A. H₂O₂ y B. MDA después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de *J. curcas*, variedad I-52. 68
- Figura 17.** Niveles de antocianinas en diferentes grados de pigmentación en las hojas de *J. curcas*, variedad I-52. 72
- Figura 18.** Identificación de antocianinas en extractos de hoja de *J. curcas*, variedad I-52. A. Por HPTLC sin revelar (placas de HPTLC de sílice 60 F₂₅₄ desarrolladas en la fase móvil BAW). Carriles: 1 y 2 corresponden al extracto hidrolizado de hoja. B-D. Por HPLC (detección a 520 nm). Los Cromatogramas B-D fueron obtenidos utilizando como fase móvil acetonitrilo y 10% ácido acético, 5% acetonitrilo y 1% ácido fosfórico en agua. B. Extracto hidrolizado de uva; C. Extracto hidrolizado de hoja de *J. curcas* y D. Co-elución del extracto de uva y *J. curcas*. Picos: (1) delfinidina, (2) cianidina, (3) petunidina, (4) peonidina y (5) malvidina. Figura Insertada: espectro de UV de los picos 1 y 2. 74
- Figura 19.** HPTLC de lupeol en tallo, peciolo y hoja. A. Placa de HPTLC sílice 60 F₂₅₄ revelada con anisaldehído y H₂SO₄; se uso la fase móvil hexano: acetona, 9:1. Std Lu: estándar de lupeol. B. valores arbitrarios de lupeol obtenidos del análisis de HPTLC de extractos de tejido de tallo, peciolo y hoja (200 mg/ PS). 75
- Figura 20.** Cromatograma del extracto de hoja de *J. curcas* obtenido luego de la separación de HPLC, donde se muestra la identificación de lupeol (1, t_R =18.05 min detectado a 205 nm) utilizando como fase móvil metanol y agua en una relación 90 :10. 76
- Figura 21.** Brotes de *J. curcas*, variedad Chiapas obtenidos *in vitro*. A. Presencia de brotes en explante de nodos después de 21 d. B. Presencia de brotes en explante de hoja después de 27 d. C. Brotes desarrollados en explante de hoja a los 42 d. 77
- Figura 22.** Cultivo de callos (A-D) y células en suspensión (E y F). A. Callos crecidos en fotoperiodo (medio B5). B. Callos crecidos en oscuridad (medio B5). C. Callos crecidos en oscuridad (medio MS). D. Callo crecido en oscuridad en medio B5 suplementado con picloram (8.3 µM) y ANA (5.4 µM). Cultivo de células en suspensión después de tres resiembras crecidas en medio B5 suplementados con: E. 4.1 µM de picloram y 2.7 de ANA y F. 8.3 µM de picloram y 5.4 µM de ANA. 83

Índice de figuras anexo

Figura 1. Clasificación de flavonoides en base a su estructura química según Winkel-Shirley (2001).	120
Figura 2. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos metanólicos de diferentes tejidos de plantas de <i>J. curcas</i> de 75 d infestada por ácaros. Placa de sílice 60 F ₂₅₄ desarrollada en fase móvil tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: agua (16:8:2:1) y reveladas con PEG-3350 y DPBA.	121
Figura 3. Cromatograma de estándares de flavonoides: a. kaempferol. b. Apigenina. c. Vitexina obtenido por HPLC (detección a 333 nm) usando como fase móvil metanol y 0.1% TFA en agua en un sistema por gradiente de acuerdo a Liu et al. (2010).	122

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto del estrés sobre la respuesta antioxidante en plantas y en cultivo de callos en <i>J. curcas</i> .	3
Tabla 2. Triterpenos identificados en diferentes partes de la planta de <i>J. curcas</i> .	4
Tabla 3. Flavonoides identificados en diferentes partes de la planta y en cultivo de callo de <i>J. curcas</i> .	5
Tabla 4. Cultivo de callos y células en suspensión de <i>J. curcas</i> .	7
Tabla 5. Fases móviles y reveladores utilizados en la identificación de flavonoides, antocianinas y triterpenos.	34
Tabla 6. <i>R_f</i> de antocianinas utilizando la fase móvil BAW (4:1:5) según Harborne (1967).	35
Tabla 7. Combinación de reguladores de crecimiento adicionados al medio B5.	41
Tabla 8. Valores de <i>R_f</i> de fenoles y flavonoides en diferentes tejidos de <i>J. curcas</i> variedad I-64.	44
Tabla 9. Actividad de CAT, APX y GR en las hojas de plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-Chiapas expuestas durante 48 h a 10 °C.	49
Tabla 10. Actividad enzimática de CAT y APX después de 48 h de tratamiento con AJ y 5 °C en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52.	63
Tabla 11. Concentración de α -tocoferol, flavonoides totales y antocianinas después de 48 h de tratamiento con AJ y 5 °C en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52.	64
Tabla 12. Actividad enzimática de CAT y APX después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52.	69
Tabla 13. Concentración de α -tocoferol, flavonoides totales y antocianinas después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52.	71
Tabla 14. Resultado del análisis de HPLC de extractos de uva y hojas de <i>J. curcas</i> , variedad I-52.	73
Tabla 15. Efecto del tipo de explante y tipo de medio en la inducción de brotes de <i>J. curcas</i> después de 42 d.	78
Tabla 16. Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de brotes de <i>J. curcas</i> a partir de explantes de cotiledón cultivado de forma abaxial después de 42 d.	80
Tabla 17. Efecto de la condición fotoperiodo y oscuridad en la morfología del callo a partir de explantes de hoja de <i>J. curcas</i> .	82

Tabla 18. Efecto de diferentes concentraciones de picloram y ANA en la morfología de callos derivados de hoja de <i>J. curcas</i> a los 28 d.	84
Table 19. Efecto de la concentración de PEG en la acumulación de biomasa y concentración de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de <i>J. curcas</i> .	86
Table 20. Efecto de la concentración de H ₂ O ₂ en la acumulación de biomasa y producción de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de <i>J. curcas</i> .	87
Table 21. Efecto de la concentración de BSO en la acumulación de biomasa y producción de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de <i>J. curcas</i> .	89

Índice de Tablas Anexo

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Gamborg's B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968) y del medio de cultivo Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962).	123
--	-----

Resumen

En este trabajo los cambios en los metabolitos de defensa como flavonoides, antocianinas, triterpenos, tocoferoles y su relación con el sistema antioxidante enzimático, en respuesta a diversos factores de estrés fueron evaluados en cultivos de *Jatropha curcas* mexicanas de variedades no tóxicas y tóxicas, distinguiéndose estas últimas por la presencia de esteroides de forbol todas provenientes de Veracruz.

El efecto del frío (10 °C) sobre las plantas de *J. curcas* de la variedad I-Chiapas provocó un incremento en la acumulación de flavonoides totales (1.4 veces mayor al control) en respuesta al estrés oxidativo (niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y malondialdehído (MDA) 2 veces mayor al control) generado después de 48 h, a pesar del incremento de 2.6 veces de la actividad de catalasa (CAT), 2.5 veces ascorbato peroxidasa (APX) y 4.0 veces la glutatión reductasa (GR) con respecto al control. Por otra parte, las hojas de las plantas tratadas con ácido abscísico (ABA) y expuestas al frío (10 °C) mostraron un aumento en la intensidad de la fluorescencia de los flavonoides y una disminución del 80% en la acumulación de H₂O₂ en el mesófilo de la hoja. En hojas de *J. curcas* haciendo uso de técnicas cromatográficas, HPTLC y HPLC, se identificaron y cuantificaron los flavonoides (kaempferol, apigenina, vitexina e isovitexina). El efecto del ácido jasmónico (AJ) aplicado en hojas de plantas de *J. curcas* (75 d), variedad I-64 no tóxica, generó una acumulación de 3.3 veces en flavonoides totales en la concentración de 1.0 mM que con 0.25 y 0.5 mM de AJ por 120 h. La elicitación durante 120 h con AJ 1 mM en la variedad I-64 mostró una mayor (2.3 veces) actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual estuvo asociada a una alta acumulación de flavonoides totales (2.1 veces) y concentración en kaempferol, apigenina, vitexina e isovitexina en comparación con la variedad I-52 tóxica. La variedad I-52 se caracterizó por acumular antocianinas hasta 1.8 veces más comparada a la variedad I-64 después de 120 h. Las plantas de la variedad I-52 expuestas a

estrés por frío (5 °C) después de 48 h del tratamiento acumularon 9.9 veces las antocianinas con respecto al control, además presentaron síntomas de daño evaluado por el incremento de hasta 2.4 y 1.4 veces en los niveles de MDA y H₂O₂ respectivamente, con respecto al control. La aplicación de AJ 1 mM a las plantas expuestas a frío (5 °C) aumentó las actividades de las enzimas antioxidantes (CAT y APX) y 1.8 veces la acumulación de flavonoides totales, mientras que los niveles de MDA, H₂O₂ y antocianinas disminuyeron 27, 23 y 67% respectivamente, con respecto al tratamiento a 5 °C. El efecto de la sacarosa (300 mM) aplicada en las hojas durante 5d provocó un incremento en la actividad de la CAT en un 42% y una acumulación de 1.6 veces de los metabolitos flavonoides y antocianinas asociado al estrés oxidativo (incremento de H₂O₂ y MDA de 3.5 y 1.9 veces respectivamente) comparado al control. Las plantas tratadas con AJ 1 mM y sacarosa (AJ + sacarosa) mostraron un aumento en la actividad de CAT y APX (2.5 y 5 veces respectivamente), así como la acumulación de antocianinas de hasta 7 veces y sin evidencias de daño oxidativo en comparación con el tratamiento de sacarosa. El explante de hoja y el medio basal B5 con los reguladores de crecimiento como BAP (2.5 μM) y la combinación de Picloram (8.3 μM) y NAA (5.4 μM) favorecieron la inducción de brotes y callo friable en *J. curcas* respectivamente, mientras la reducción a la mitad de las concentraciones de estos reguladores favorecieron los cultivos en suspensión. La elicitación en cultivo de células en suspensión con 200 μM de H₂O₂ incrementó 3.3 veces la acumulación de lupeol (de 172.77 ± 35.22 μg/g PS a 578.25 ± 94.94 μg/g PS), mientras que 600 μM de BSO favoreció la producción de ácido betulínico en 2.4 veces (de 299.48 ± 1.31 μg/g PS a 722.24 ± 78.44 μg/g PS) y el polietilenglicol (PEG) al 5% incrementó el lupeol en 3.6 veces (de 172.77 ± 35.22 μg/g PS a 616.75 ± 66.83 μg/g PS).

Abstract

In this work, the effect of several stress factors on changes in the content of defense metabolites (flavonoids, anthocyanins, triterpenes and α -tocopherol) and their relationship with the enzymatic antioxidant system were evaluated in Mexican *Jatropha curcas* plants of toxic and non-toxic accessions from Veracruz. The effect of chilling (10 °C) in I-Chiapas accession of *J. curcas* plants led to a significant increase in total flavonoids accumulation (1.4 times to control) in response to oxidative stress evaluated with 2 fold high levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde levels (MDA) respect to control; despite 2.6-fold increases in catalase activity (CAT), 2.5-fold ascorbate peroxidase (APX) and 4.0-fold glutathione reductase (GR) over the control after 48 h of treatment. By the other hand, an experiment *in situ* with leaves of I-Chiapas accession plants treated with abscisic acid (ABA) and exposed to chilling (10 °C) showed an increase on fluorescence intensity corresponding to flavonoids and a decrease on accumulation of H₂O₂ by 80% in mesophyll cells. The flavonoids (kaempferol, apigenin, vitexin and isovitexin) were identified and quantified in *J. curcas* leaves using two chromatographic techniques, HPTLC and HPLC. The application of 1 mM jasmonic acid (JA) on leaves of I-64 non-toxic accession *J. curcas* plants (75 d), caused a significant increase in total flavonoids accumulation of 3.3 times with respect to 0.25 and 0.5 mM JA after 120 h. Elicitation with 1 mM JA for 120 h in the I-64 accession showed a higher activity of PAL (2.3-fold), which was correlated with a high accumulation of total flavonoids (2.1-fold) and concentration in kaempferol, apigenin, vitexin and isovitexin, than the toxic I-52 accession. In that same time of elicitation, anthocyanin content in I-52 accession plant was accumulated up to 1.8 times with respect to I-64 accession plant.

In other experiment, plants of I-52 accession exposed to chilling at 5 °C for 48 h of treatment had an accumulation in anthocyanin content of up to 9.9 fold with respect to the

control; also they showed symptoms of damage evaluated by an increase in MDA and H₂O₂ concentration up to 2.4- and 1.4-fold respectively, with respect to control. In contrast, application of 1 mM JA to plants exposed to chilling increased the activities of antioxidant enzymes (CAT and APX) and accumulation of total flavonoids by 1.8 times, whereas MDA, H₂O₂ and anthocyanin levels decreased at 27, 23 and 67% respectively, with respect to chilling treatment. In I-52 plants treated with 300 mM of sucrose for 5 d increased CAT activity by 42% and a 1.6-fold accumulation of flavonoids and anthocyanins with respect to the control; these metabolites were associated with oxidative stress (increase of H₂O₂ and MDA at 3.5- and 1.9-fold respectively). Plants treated with 1 mM AJ in combination with sucrose (AJ + sucrose) showed an increase in CAT and APX activities (2.5- and 5-fold, respectively) as well as a 7-fold increase in anthocyanin accumulation in comparison with the sucrose treatment, without significant evidence of oxidative damage. The shoots and callus formation in *J. curcas* were obtained in Gamborg B5 medium supplemented with BAP (2.5 μM) and picloram (8.3 μM) in combination with NAA (5.4 μM), respectively, when leaf was used as explant. *J. curcas* cell suspension culture were obtained from friable callus derived from leaf explants using the Gamborg B5 medium but supplemented with the half concentration of growth regulators (4.1 μM picloram and 2.7 μM NAA). Elicitation with H₂O₂ (200 μM) and polyethylene glycol (5%) on 7-day-old cell cultures increased 3.3-fold (from 172.77 ± 35.22 μg/g WD to 578.25 ± 94.94 μg/g WD) and 3.6-fold (from 172.77 ± 35.22 μg/g WD to 616.75 ± 66.83 μg/g WD) the content of lupeol respectively, while the addition of buthionine of sulfoximine 600 μM induced 2.4-fold betulinic acid concentration (from 299.48 ± 1.31 μg/g WD to 722.24 ± 78.44 μg/g WD).

1. Introducción

1.1 *Jatropha curcas*

El género *Jatropha* pertenece a la tribu Jatropeae y a la familia Euphorbiaceae que cuenta con 175 especies, 45 de ellas se encuentran en México, donde el 77% son endémicas (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009; Divakara *et al.*, 2010). Entre las especies del género *Jatropha* destaca *Jatropha curcas*, comúnmente conocida en México como “piñoncillo”, “piñón o pistache mexicano y piñón manso”.

Jatropha curcas L., es un arbusto perenne que crece hasta ocho metros de alto en condiciones favorables y se caracteriza por sobrevivir a un intervalo amplio de condiciones ambientales como salinidad, sequía y contaminación por metales pesados; su adaptación a este tipo de condiciones quizá este principalmente asociado al desarrollo de diferentes estrategias metabólicas (Tabla 1). Sin embargo las bajas temperaturas afectan la arquitectura de la planta, lo que dificulta su establecimiento en este tipo de clima (Zheng *et al.*, 2009; Divakara *et al.*, 2010).

Jatropha curcas se le considera nativa de América Central (Divakara *et al.*, 2010) y se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluido México por su adaptabilidad a distintas condiciones de suelo (Openshaw, 2000; Valdés-Rodríguez *et al.*, 2013).

Las accesiones de *J. curcas* han sido consideradas tóxicas y no tóxicas por la presencia y ausencia de ésteres de forbol (diterpenoides) en el aceite y en diferentes componentes estructurales de las semillas. Estos compuestos diterpenoides provocan intoxicación en los humanos y animales por su consumo (Makkar *et al.*, 1997 y 1998; Haas *et al.*, 2002). Las

diferencias significativas entre accesiones tóxicas y no tóxicas son con base en el contenido de ésteres de forbol y no a su morfología (Makkar et al., 1998). Sin embargo, en México se han reportado genotipos con una toxicidad baja o nula (Makkar et al., 1998; Herrera et al., 2010; Zavala del Angel et al., 2016). Estudios moleculares han revelado una alta variabilidad genética en las accesiones mexicanas de *J. curcas* en comparación con las accesiones de Asia y África (Salvador-Figueroa et al., 2015; Ovando-Medina et al., 2011). El germoplasma mexicano posee una mayor variabilidad en semillas en relación a sus características físicas y químicas (Ovando Medina et al., 2011). Particularmente, en el estado de Veracruz, un análisis del germoplasma basado en su caracterización química y contenido de ésteres de forbol permitió distinguir genotipos no tóxicos de 38 accesiones de *J. curcas*, donde los forboles no fueron detectados y tóxicos (forboles de 0.12 a 0.66 mg/g). Además el porcentaje de aceite en semilla varió de 26 a 55% , donde el ácido oleico y linoleico tuvieron una mayor proporción, lo cual permite que las accesiones no tóxicas sean una fuente promisoría para los programas de mejoramiento (Zavala del Angel et al., 2016).

Jatropha curcas, es una planta con muchos atributos, en los últimos años se ha destacado por su potencial para la producción sostenible de biocombustible, ya que su semilla presenta de 30 a 40% de aceite, con un patrón de ácidos grasos similar al de los aceites comestibles (Divakara et al., 2010); además de presentar un potencial en el área medicinal por la presencia de compuestos bioactivos de interés y con usos terapéuticos (Kumar and Sharma, 2008).

Tabla 1. Efecto del estrés sobre la respuesta antioxidante en plantas y en cultivo de callos en *J. curcas*.

Tipo de Cultivo	Variedad	Tipo de estrés	Respuesta al estrés	Referencia
Plantas	China	Metales pesados (Plomo)	Incremento de la actividad de SOD, POD, CAT y altos niveles de MDA	Shu et al., (2011)
Plantas	Hindú	Metales pesados (Cromo)	Incremento de la actividad GST y CAT y aumento del GSSH	Yadav et al., (2010)
Plantas	Asiática	Sequía y daño mecánico	Incremento en la concentración de flavonoides	Lama et al., (2016)
Plantas	Brasileña	Salinidad-altas temperaturas (43 °C)	Estimulación del sistema antioxidante (APX, SOD y CAT), incremento de MDA	Silva et al., (2013)
Plantas	Brasileña	Salinidad	Aumento de H ₂ O ₂ y MDA, disminución de la actividad CAT, APX	Campos et al., (2012)
Plantas	China	Salinidad	Incremento de la actividad de SOD, POD, CAT y PAL	Gao et al., (2008)
Plantas	Brasileña	Sequía	Incremento de la actividad de SOD, POD, CAT	Pompelli et al., (2010)
Plantas	Brasileña	Sequía y altas temperaturas (43 °C)	Estimulación del sistema antioxidante (APX, SOD y CAT), incremento en los niveles de H ₂ O ₂ y parametros fotosintéticos	Silva et al., 2010
Plantas	Asiática	Frío (4-6 °C)	Disminución en la tasa fotosintética e incremento de niveles de MDA	Zheng et al., (2009)
Plantas	Asiática	Frío (4 °C)	Pequeña disminución en parametros fotosintéticos y cambios a nivel de proteínas CAT, GR y cisteina sintasa	Liang et al., (2007)
Callos	Asiática	UV-B	Aumento de la concentración de flavonoides (Apigenina, vitexina e isovitexina)	Alvero-Bascos y Ungson (2012)
Callos	Hindú	Salinidad (NaCl)	Incremento de la actividad de SOD, POD, CAT	Kumar et al., (2008)

Jatropha curcas ha sido empleada en la medicina tradicional en los países tropicales y subtropicales de África y Asia (Lans et al., 2001). Todas las partes vegetativas de *J. curcas* (semillas, hojas, tallos, corteza y raíz) han sido utilizadas para el tratamiento y prevención de una amplia variedad de enfermedades como lo son: alergias, reumatismo, diarrea, tumores, disentería, hemorragia vaginal entre otras (Prasad et al., 2012; Sabandar et al., 2013). Investigaciones sobre los componentes químicos de *J. curcas* resultaron en el aislamiento de una variedad de fitoquímicos como triterpenoides (Tabla 2) y flavonoides (Tabla 3) entre otros, que muestran un amplio espectro de actividad biológica (Prasad et al., 2012; Sabandar et al., 2013).

Tabla 2. Triterpenos identificados en diferentes partes de la planta de *J. curcas*.

Parte de la planta	Triterpenos	Referencias
Semillas (endospermo)	Taraxerol	Mitra et al., (1970)
Semillas (aceite)	Taraxasterol, α -amirina, isomultiflorenol, butospermol, taraxerol, tírucalol, eufol, lupeol	Adebowale y Adedire (2006)
Hojas	Derivado de ácido oleanólico (3-O-(Z)-coumaroil de ácido oleanólico) 1-triacontanol dotriacontanol, β -amirina	Ravindranath et al., (2004) Neuwinger 1994 Wang et al., (2009)
Tallo (corteza)	Lupeol Ácido oleanólico Taraxerol, β -amirina Jatrocurina, friedelina, epi-friedelinol	Falodun et al., (2011) Mitra et al., (1970) Talapatra et al., (1993)
Raíz	Taraxerol	Ling-yi et al., (1996)

Las hojas han sido usadas como infusión para el tratamiento de hemorragias vaginales, mientras que la aplicación directa de las hojas ha sido utilizada para la ictericia, fiebre, malaria e infecciones (Prasad et al., 2012); esta acción farmacológica quizá este asociado a la presencia de triterpenoides y flavonoides (Chhabra et al., 1990; Ebuehi y Okorie, 2009). Los flavonoides que han sido aislados en hojas de *J. curcas* incluyen kaempferol, apigenina y sus glúcidos, así como vitexina e isovitexina (Ebuehi y Okorie, 2009; Huang et al., 2014). A estos compuestos se les ha atribuido actividades farmacológicas, como antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales y actividad foto-protectora (McVean et al., 2000; Lin et al., 2005; Szliszka et al., 2008), haciéndolos atractivos y valiosos en el campo medicinal.

Tabla 3. Flavonoides identificados en diferentes partes de la planta y en cultivo de callo de *J. curcas*.

Parte de la planta/cultivo <i>in vitro</i>	Flavonoides	Referencias
Semillas (endospermo)	Rutina, myricetina	Oskoueian et al., 2011
Hojas	Orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, Apigenina, Apigetrina (apigenina 7-O- β -D- galactósido) rhoifolina (Apigenina-7-O-neohesperidosido), vicenina II (Apigenina 6,8-diglucósido), biapigenina-(8,8'')-metileno-6,6''-di-C- β -D-glucopiranósido, rutina ,naringina, isoquercetina	Subramanian et al., (1971); Abd-Alla et al., (2009); Namuli et al., (2011); Alvero-Bascos y Ungson (2012); El-Baz et al., (2014); Huang et al., (2014);
Tallo (corteza)	Naringina	Namuli et al., (2011)
Raíz	Naringina, nobiletina	Ling-yi et al., (1996); Namuli et al., (2011)
Cultivo de callo	Apigenina	Alvero-Bascos y Ungson (2012)

1.1.1 Cultivo *in vitro* de *J. curcas*

Los cultivos de tejidos y de células vegetales proporcionan una herramienta alternativa a las plantas que son difíciles de cultivar, o tienen un periodo de cultivo largo, o bien presentan bajos rendimientos en los metabolitos con alto valor comercial (Karuppusamy 2009). La propagación de *J. curcas* mediante el cultivo de tejidos recientemente ha sido el foco de atención para diversos estudios por la calidad del aceite de su semilla, el cual puede ser utilizado para la producción de biocombustible (Debnath y Bisen 2008). Sin embargo, el cultivo de callos y células en suspensión de *J. curcas* ha sido establecidos por diferentes protocolos y en estos se ha evaluado la composición de ácidos grasos, dejando a un lado la producción de otros metabolitos de importancia (Tabla 4). El cultivo de células en suspensión de *J. curcas* ha representado ser una alternativa biotecnológica para la producción de lípidos (Correa y Atehortúa 2012). Así mismo, también proveen una fuente sustentable para la producción de productos naturales incluyendo metabolitos de importancia farmacológica como lupeol, ácido betulínico (Zaragoza-Martínez et al., 2016) y flavonoides (Alvero-Bascos y Ungson 2012).

Tabla 4. Cultivo de callos y células en suspensión de *J. curcas*.

Tipo de explante	Medio MS/ reguladores de crecimiento	Tipo de cultivo <i>in vitro</i>	Elicitación	Metabolitos	Referencia
Hoja	NAA 20 μ M y KIN 20 μ M	Callo (luz)	UV-B	Apigenina, vitexina, isovitexina	Alvero-Bascos y Ungson (2012)
Hoja	NAA 1 mg/L y BAP 5mg/L	Callo (oscuridad)	NaCl	-	Kumar et al., (2008)
Cotiledón (semilla)	2,4-D 5 μ M y BAP 2.5 μ M	Célula en suspensión (luz)	-	Ácidos grasos	Ovando-Medina et al., 2016
Hoja	NAA 2mg/L y BAP 0.5 mg/L	Células en suspensión (luz)	-	Ácidos grasos	Elfahmi y Ruslan (2011)
Hipocótilo	2,4-D 0.5 mg/L y leche de coco al 2%	Célula en suspensión (luz)	-	-	Soomro y Memon (2007)

Reguladores de crecimiento: NAA: Ácido naftalenacético, BAP: Bencilaminopurina, 2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, Kin: cinetina. Medio MS: Murashige y Skoog (1962).

1.2 Funciones y biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides son un grupo diverso de metabolitos secundarios con diferentes funciones metabólicas en las plantas (Winkel-Shirley 2001; Winkel 2006). De acuerdo a su estructura química se pueden clasificar en ocho clases: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavandioles, flavandoles, antocianidinas, isoflavonas y chalconas (Winkel-Shirley 2001; Martens et al., 2010). Es importante mencionar que los flavonoides difieren por su grado de oxidación y patrón de oxidación en el anillo C (Anexo, Figura 1) mientras que en cada clase los compuestos se diferencian en el patrón de sustitución del anillo A y B (Winkel-Shirley

2001; Ferrer et al., 2008). Se conocen aproximadamente 10000 estructuras de flavonoides diferentes en las plantas (Harborne y Williams 2000; Ferrer et al., 2008).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos y presentes en diferentes concentraciones según las especie, órgano de la planta, estado de desarrollo y condición de crecimiento (Debeaujon et al., 2001). Los flavonoides están involucrados en funciones de desarrollo fisiológico (Mol et al., 1998) respuesta al estrés biótico y abiótico, actuando como secuestradores de radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Winkel-Shirley 2002; Williams et al., 2004). Además, los flavonoides por sus efectos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, cardio y neuroprotectores en tejidos de mamíferos han sido considerados de interés farmacológico (McVean et al., 2000; Winkel-Shirley 2001; Huang et al., 2014).

Los flavonoides son sintetizados por la ruta de los fenilpropanoides, a través de la transformación de la fenilalanina en ácido *trans*-cinámico catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL), el ácido *trans*-cinámico es transformado en ácido *p*-coumárico y la acción de una CoA ligasa lo convierte en *p*-coumaroil CoA (Figura 1). La biosíntesis de los flavonoides inicia con la conversión de la *p*-coumaroil CoA a naringenina chalcona por la chalcona sintasa (CHS). La naringenina chalcona es entonces catalizada por la chalcona isomerasa (CHI) para formar la naringenina, la cual es convertida a flavona por una flavona sintasa (FNS). Por otra parte, la oxidación de la naringenina por una flavona 3-hidrolasa (F3H) forma el dihidrokaempferol (DHK), subsecuentemente, este compuesto puede ser hidroxilado en la posición 3' o 5' del anillo por la flavona 3'-hidrolasa o 5'-hidrolasa para producir respectivamente, dihidroquercetina (DHQ) o dihidromiricetina (DHM). Además, el DHK puede ser convertido en flavonol por la flavonol sintasa (FLS). La DHQ, DHM y el DHK son convertidos por la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) a

leucocianidina, leucopelargonina y leucodelfinidina, respectivamente, para la biosíntesis de antocianinas (Winkel-Shirley 2001; Stracke et al., 2007; Ferrer et al., 2008).

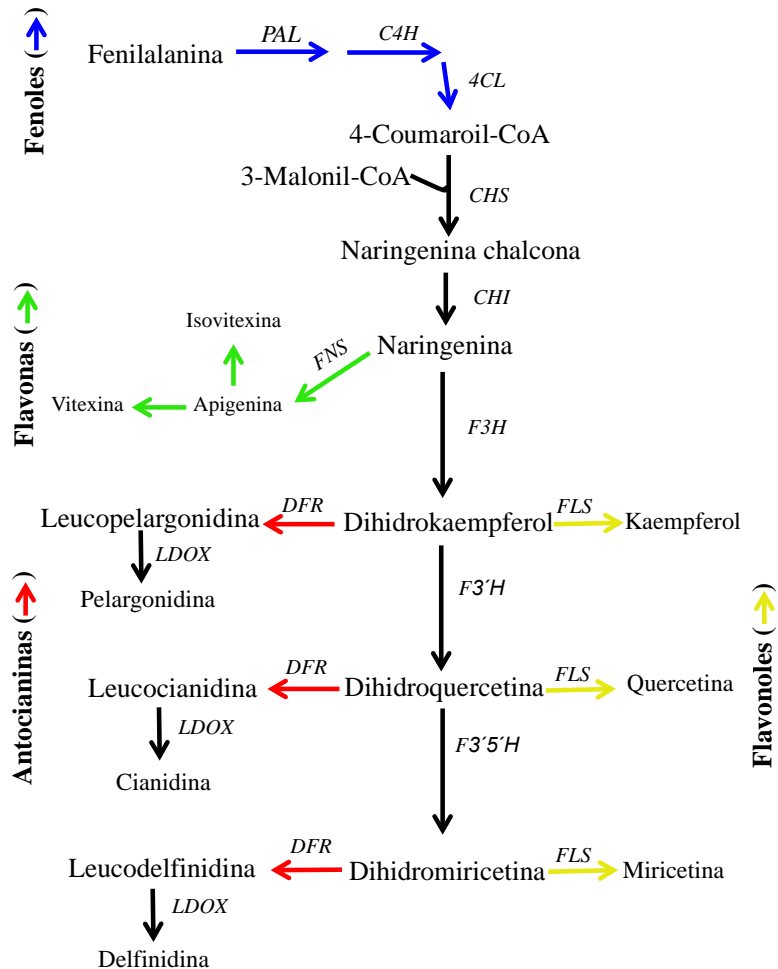


Figura 1. Ruta de biosíntesis de flavonoides en plantas. PAL: fenil alanina amonioliasa; C4H: ácido cinámico 4-hidrolasa; 4CL: ácido cinámico CoA ligasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; FNS: flavona sintasa; F3H: flavona 3-hidrolasa; F3'5'H: Flavona 3'5'-hidrolasa; FLS: flavonol sintasa; DFR: dihidroflavonol 4-reductasa; LDOX: leucoantocianidina dioxigenasa (Stracke et al., 2007; Ferrer et al., 2008).

1.3 El estrés por frío y el osmótico activan la biosíntesis de flavonoides

El estrés por frío (temperaturas inferiores a 15 °C) es uno de los tipos de estrés más nocivos que afectan las plantas de origen tropical o subtropical (Allen y Ort 2001). Las plantas se han adaptado a las variaciones de temperatura mediante el ajuste de su metabolismo, aumentando la concentración de compuestos protectores (Figura 2) para aumentar la tolerancia al frío (Janská et al., 2010). Se ha reportado que las antocianinas, una clase de flavonoides, se acumulan en algunas plantas expuestas bajo estrés por frío (Winkel-Shirley 2002). Koehler et al. (2012) en un análisis proteómico de coronas de cuatro variedades de plantas de fresa (*Fragaria x ananasa*) encontraron que la tolerancia de las plantas está principalmente asociada a la participación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas. Diferentes estudios han demostrado que los niveles de flavonoides o antocianinas presentes en el área foliar de las plantas estarían contribuyendo al control del potencial osmótico, para hacer frente a las condiciones adversas impuestas por el estrés al frío (Chalker-Scott 2002; Hughes et al., 2013; Zhu et al., 2013).

El incremento de la concentración de los flavonoides en las hojas ha sido correlacionado con la tolerancia de las plantas al frío (Chalker-Scott 1999). La aclimatación de las plantas al efecto del frío incluye entre otros eventos un aumento notable en la actividad de la PAL, resultando en la acumulación de flavonoides la cual depende del intervalo de temperatura al cual éstas son expuestas (Stefanowska et al., 2002). Los flavonoides podrían desempeñar un papel funcional en la aclimatación y tolerancia de las plantas al frío por sus propiedades antioxidantes (Rice-Evans et al., 1997) o por su participación en la protección del daño osmótico y fotooxidativo (Gould et al., 2002; Agati et al., 2007; Agati et al., 2009).

Recientemente se ha reportado, mediante análisis transcriptómico de *Citrus sinensis*, un aumento en los niveles de los transcritos involucrados en la biosíntesis de flavonoides bajo condiciones de estrés por frío, lo cual podría estar asociado en la protección de la planta contra el daño oxidativo (Crifò et al., 2012; Theocharis et al., 2012). Por ejemplo, el daño oxidativo puede ser disminuido por la presencia de flavonoides glucosilados con anillo de tipo B-dihidroxi, los cuales interactúan con la cabezas polares de los lípidos de membrana (Agati et al., 2007; Korn et al., 2008).

Por otra parte el uso de polioles, NaCl, agentes osmóticos como PEG o azúcares, conduce a una deshidratación celular, lo que provoca el estrés osmótico y la eliminación de agua del citoplasma, que resulta en una reducción del espacio citoplásmico y vacuolar intracelular (Mahajan y Tuteja 2005). Los flavonoides (antocianinas y proantocianidinas) se producen usualmente en las vacuolas de las células epidermales, lo que implica que podrían prevenir el daño oxidativo (Hernández et al., 2009) y su sobreacumulación podría resultar en la tolerancia al estrés oxidativo e hídrico (Nakabayashi et al., 2014). Además, se ha sugerido que las antocianinas podrían contribuir en el mantenimiento de los niveles hídricos de diversas especies de plantas (Chalker-Scott 2002; Hughes et al., 2013; Nakabayashi et al., 2014).

Se ha reportado que la acumulación de antocianinas es estimulada por el estrés osmótico inducido por el efecto de la sacarosa (Solfanelli et al., 2006). Esta respuesta ha sido observada en brotes de brócoli (Guo et al., 2011), hipocotilos de *Rhaphanus sativus* (Hara et al., 2004) bajo el tratamiento con sacarosa. Teng et al. (2005) han mostrado que la regulación de la biosíntesis de antocianinas bajo el tratamiento con sacarosa está dada principalmente por la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción MYB75/PAP1. Por tanto, se sugiere que los flavonoides y antocianinas podrían actuar

como antioxidantes y osmoprotectores, protegiendo a las plantas del estrés osmótico (Rice-Evans et al., 1997; Agati et al., 2007; Nakabayashi et al., 2014).

1.4 El estrés por frío y el osmótico inducen cambios en la respuesta antioxidante

El ambiente oxidativo es generado cuando las ERO's son producidas por un estrés o una combinación múltiple de tipos de estrés (Thorpe et al., 2004). Se ha estudiado que el estrés por frío y el estrés osmótico (Figura 2) inducen la generación de ERO's, tal como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Prasad et al., 1994; Mahajan y Tuteja 2005). La producción de ERO's se da a nivel de cloroplastos y peroxisomas en condiciones de luz, pero en condiciones de oscuridad las ERO's se generan significativamente en las mitocondrias (Foyer y Noctor, 2005b).

El estrés por frío afecta la fluidez de la membrana produciendo la peroxidación autocatalítica de los lípidos de la membrana por la sobre producción de ERO's generados (Mahajan y Tuteja 2005). Se ha reportado que especies de plantas no tolerantes al estrés por frío muestran un mayor incremento de los niveles de malondialdehído (MDA) (Prasad, 1996; Posmyk et al., 2005). Estudios recientes han demostrado que las ERO's generadas en el estrés por frío desempeñan un papel clave en la mediación de eventos en la traducción de señales que controlan los procesos de muerte celular programada, la activación de los mecanismos de detoxificación de ERO's y la activación de biosíntesis de metabolitos secundarios (Suzuki y Mittler, 2006).

Dentro de los mecanismos de desintoxicación de ERO's durante el metabolismo normal y particularmente durante el estrés (Figura 2), se encuentran los antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión y α -tocoferol, así como las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa SOD, catalasa CAT, peroxidasa POD entre otras) las cuales secuestran las

ERO's asegurando así la función normal de las células (Mittler et al., 2004). Las enzimas antioxidantes CAT, ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) juegan un papel importante en la regulación de los niveles de H₂O₂ en el sistema celular (Mittler, 2002). El grado de daño inducido por los niveles de ERO's dependerá de la participación del sistema antioxidante (Mittler 2002). Se ha asociado que el aumento en la actividad de estas enzimas antioxidantes le confiere a las plantas mayor tolerancia al estrés oxidativo generado por el estrés por frío (Prasad, 1996; Parida y Das 2005), La enzima CAT ha recibido la mayor atención con respecto a la respuesta de las plantas al estrés por frío y se cree que desempeña un papel importante en la tolerancia de las plantas a este estrés (Prasad, 1996) .

Por otro lado, el estrés osmótico (Figura 2) afecta el potencial iónico y osmótico de la célula, debido al flujo de agua desde el interior de la célula hacia el medio extracelular, lo cual ocasiona estrés oxidativo por el exceso de las ERO's (Mahajan y Tuteja 2005). El reciclamiento de las ERO's se lleva a cabo por la participación de compuestos antioxidantes como ácido ascórbico y glutatión y las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, POD, CAT) (Mittler et al., 2004; Foyer y Noctor, 2005b). La participación de estas enzimas en el reciclamiento de ERO's se correlaciona con la tolerancia de las plantas al estrés osmótico. Se ha reportado que especies de plantas no tolerantes al estrés osmótico muestran un mayor incremento de los niveles de MDA (Azevedo et al., 2009; Cui et al., 2010).

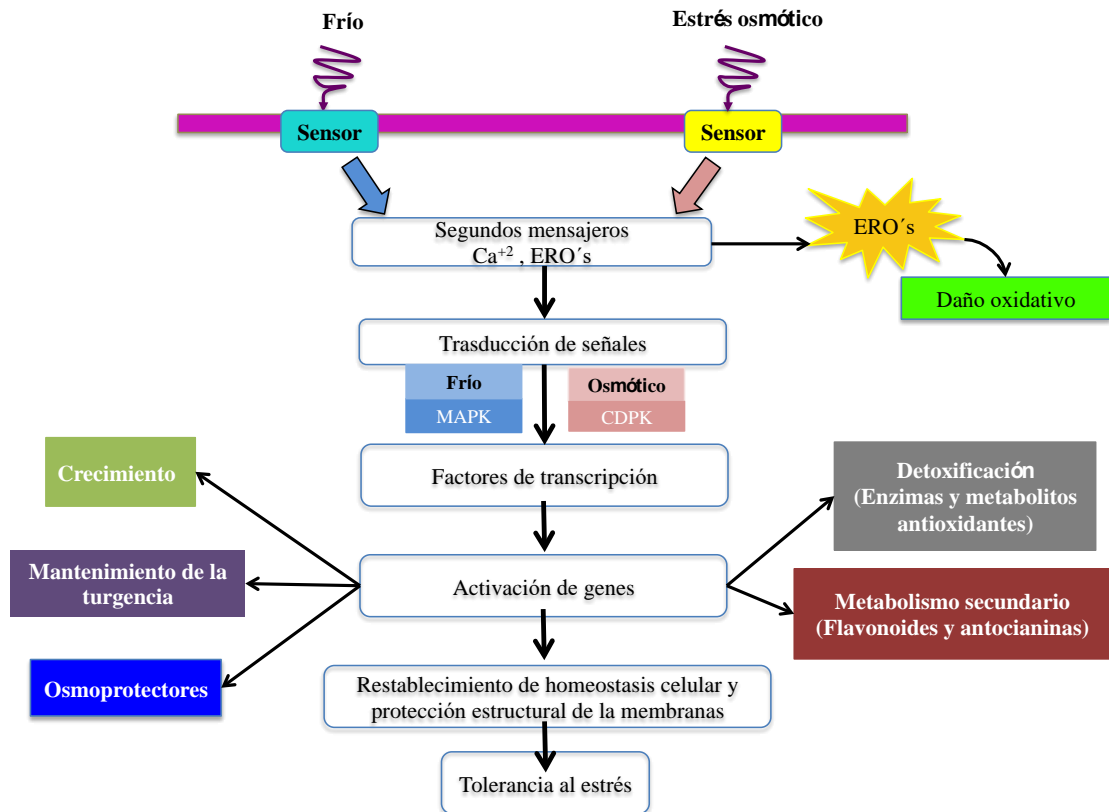


Figura 2. Representación de la señalización general del estrés por el frío y el osmótico, involucrando las respuestas al estrés. ERO's: especies reactivas de oxígeno; MAPK: proteína cinasa activadora de la mitogénesis CDPK: proteína cinasa dependiente de calcio, Ca^{+2} (modificado de Awasthi et al., 2015)

1.5 Comunicación cruzada durante la señalización del estrés biótico y abiótico

La percepción de las señales externas provocadas por el estrés biótico y abiótico generan vías de señalización cruzada. Las vías de señalización son reguladas por la participación del H_2O_2 , óxido nítrico (NO) y fitohormonas endógenas como ácido salicílico, ácido abscísico (ABA), etileno y AJ, las cuales pueden actuar de manera antagonista o sinérgica para activar las respuestas de protección o tolerancia al efecto del estrés biótico y abiótico (Fujita et al., 2006). Bajo condiciones de estrés por el frío y el osmótico (Figura 3), el ABA

es el mediador principal de las respuestas de tolerancia a través de la regulación del cierre estomático (Wilkinson et al., 2012). Además el ABA está involucrado en los procesos implicados en el crecimiento de las raíces (Zhang et al., 2006). Así mismo el ABA participa en la regulación de otros eventos metabólicos que involucran la síntesis de osmoprotectores y la activación de enzimas antioxidantes otorgando a la planta una tolerancia al proceso de deshidratación (Zhang et al., 2006).

Otras fitohormonas también pueden tener efectos directos y mediar la influencia de ABA para estimular el cierre estomático durante el estrés por frío y osmótico. Se ha propuesto que el AJ endógeno interactúa con el ABA para mediar el cierre estomático a través de la entrada de calcio extracelular y/o por la activación de la señalización del H₂O₂ y del NO en la célula guarda durante el estrés por el frío y el osmótico (Munemasa et al. 2011; Harrinson 2012). Recientemente, se ha demostrado que en plantas de *Arabidopsis* el AJ induce los genes *AtPYL4* y *AtPYL5*, los cuales codifican para receptores del ABA y se han asociado por su participación en la acumulación de antocianinas; esto sugiere que la interacción de ABA-AJ contribuye a mantener el equilibrio entre crecimiento y la defensa (Lackman et al., 2011).

Diversos tipos de estrés (bióticos y abióticos), particularmente por ataque de patógenos e insectos así como el corte (daño mecánico de tejidos), pueden desencadenar la producción de AJ endógeno de manera sistemática y local en la planta (Gundlach et al., 1992; Pauwels et al., 2008). Investigaciones recientes sugieren que el AJ juega un papel en la regulación del estrés abiótico (Khan et al., 2012). En especies de plantas tolerantes al estrés abiótico se comprobó un marcado incremento de AJ endógeno (Ismail et al., 2012; Du et al., 2013). En plantas de *Pinus pinaster*, el incremento en la concentración de AJ estaría asociado con la mediación de la tolerancia al estrés por frío y el estrés por sequía (Pedranzani et al., 2007).

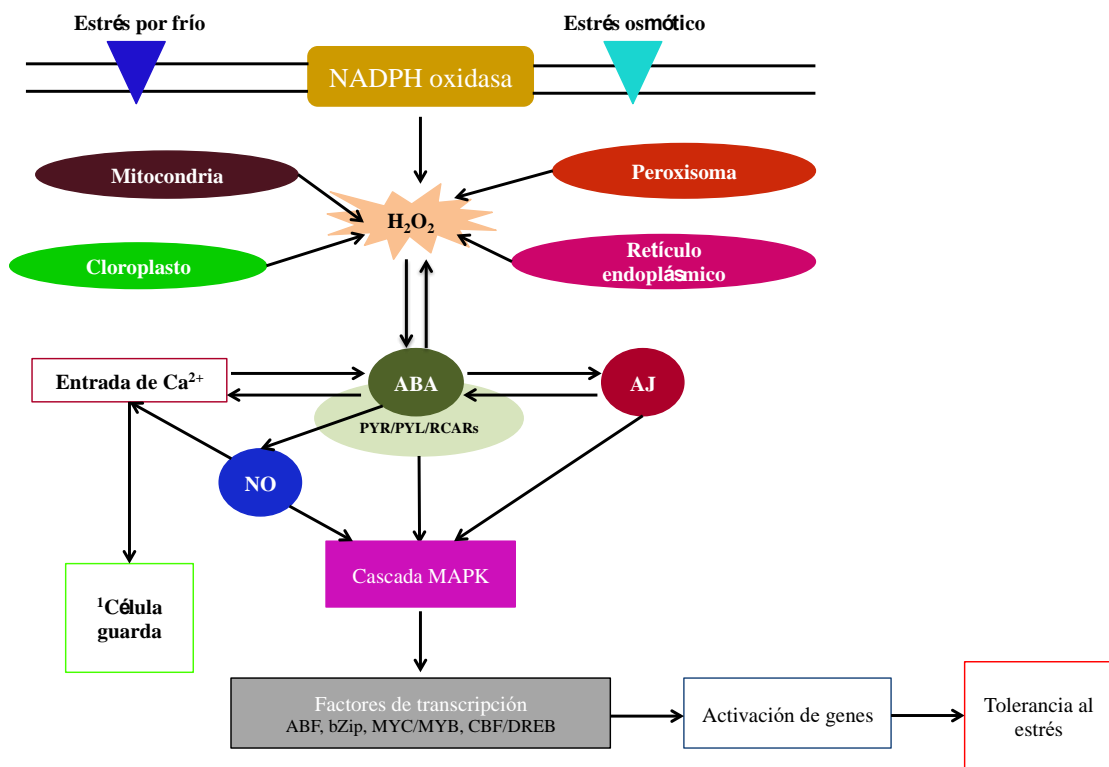


Figura 3. Representación de la posible comunicación cruzada del ABA-AJ durante el estrés por el frío y el cambio osmótico. H_2O_2 : peróxido de hidrogeno; ABA: ácido abscísico; AJ: ácido jasmónico; NO: oxido nítrico; PYR/PYL/RCARs: receptores del ABA; MAPK: proteína cinasa activadora de la mitogénesis (modificado de Saxena et al., 2016).

1.6 Ácido jasmónico, flavonoides y respuesta antioxidante

Es conocido que los jasmonatos, ácido jasmónico (AJ) y su derivado metil jasmonato (MJ) son fitohormonas que están involucradas en la regulación de diversos procesos celulares en las plantas, como el crecimiento, desarrollo e incluso en la activación de respuestas de defensa ante el estrés ambiental (Creelman y Mullet 1997; Wasternack y House, 2013).

En plantas sometidas a daño mecánico y ataque por insectos; el factor de transcripción MYC2, activa el metabolismo de flavonoides durante la señalización del AJ (Kazan y Manners, 2008). El AJ es considerado un elicitador conservado de metabolitos secundarios (Zhao et al., 2005). En relación a lo anterior, en cultivos de células o en plantas, los jasmonatos son utilizados para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios (Zhao et al., 2005a; Wasternack y House 2013) como los flavonoides (Gadzovska et al., 2007; Horbowicz et al., 2011; Shimizu et al., 2012). Diversos estudios han mostrado que la aplicación exógena del AJ podría activar las respuestas de defensa de la planta (Figura 4) como lo es la sobrerregulación de los genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas (Devoto et al., 2005; Loreti et al., 2008; Rahnamale-Tajadod et al., 2017). Los flavonoides podrían estar participando en la reducción del daño oxidativo y por tanto aumentar la tolerancia al estrés abiótico (Anjum et al., 2011; Li et al., 2012; Alam et al., 2014).

Los jasmonatos aplicados de forma exógena también ejercen en las plantas diversos efectos a nivel morfológico y fisiológico, aunado a la generación de H₂O₂ (Orozco-Cárdenas y Ryan 1999; Orozco-Cárdenas et al., 2001), como una respuesta temprana por efecto del elicitador (Zhang y Xing, 2008). El MJ aplicado de manera exógena puede generar estrés oxidativo (Kauss et al., 1994; Mur et al., 2006), además de generar MDA a nivel de las membranas celulares (Hung et al., 2004). La presencia de jasmonatos disminuye la

actividad de la CAT así como la expresión de sus isoenzimas, mientras que la actividad de la APX puede incrementar, aunque la respuesta antioxidante dependerá del tipo de planta y la dosis aplicada así como del tejido utilizado (Loreti et al., 2008; Li et al., 2012; Hu et al., 2013).

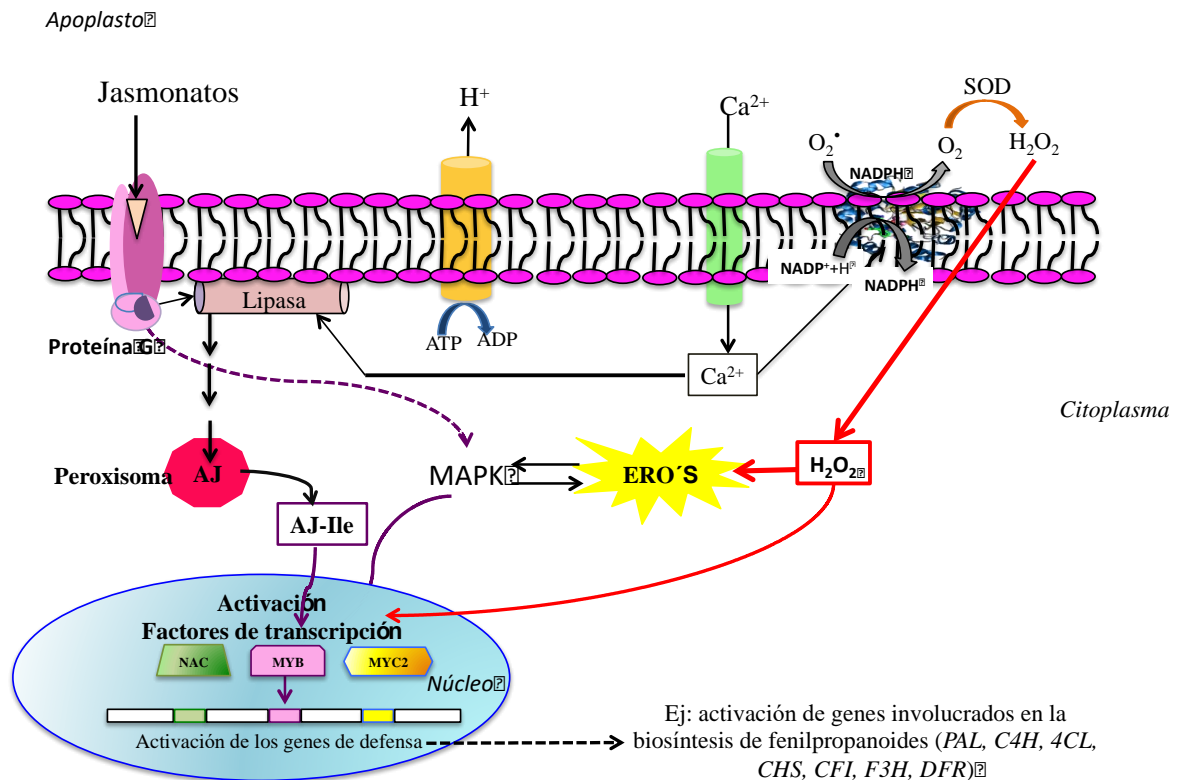


Figura 4. Representación de las posibles respuestas a la elicitación con metil jasmonato (MJ) y activación de la biosíntesis de fenilpropanoides (modificado de Zhao et al., 2005; Rahnamale-Tajadod et al., 2017).

1.7 Triterpenos, biosíntesis y elicitación

Los triterpenos pentacíclicos son uno de los grupos de isoprenoides más numerosos y diversos en las plantas, a los que se les atribuyen múltiples efectos biológicos

contribuyendo en la defensa ante patógenos y plagas (Hill y Connolly, 2015). Además de tener un intervalo amplio de aplicaciones en la industria, en particular la farmacéutica.

Los triterpenos son biosintetizados a partir del isopentenil difosfato generado por la ruta del mevalonato (Brown 1998) utilizando la enzima oxidosqualeno ciclasa, la cual convierte al 2,3 oxidosqualeno en uno o más alcoholes triterpénicos cíclicos con un máximo de seis anillos de carbono, como el lupeol, precursor del ácido betulínico (Phillips et al., 2006).

Los triterpenos pentacíclicos lupeol, betulina y ácido betulínico poseen un intervalo de actividad biológica en la prevención de enfermedades cancerígenas, coronarias, hepáticas, antiinflamatorias y VIH (Malinowska *et al.*, 2013). De acuerdo a estas propiedades, en cultivos *in vitro* y en plantas crecidas en condiciones naturales se han utilizado estrategias para el incremento de la producción de estos metabolitos secundarios a través del uso de elicitores o moléculas señal (Zhao *et al.*, 2005a). Los elicitores son compuestos químicos que desencadenan respuestas morfológicas, fisiológicas y la acumulación de metabolitos secundarios en las plantas (Benhamou, 1996). Ha sido observado que el estrés ocasionado por sequía induce la biosíntesis de triterpenos en las plantas (Nasrollahi *et al.*, 2014). En plantas de *Hypericum brasiliense* se ha reportado un incremento en la concentración de ácido betulínico, el cual fue asociado al estrés oxidativo ocasionado por la sequía (de Abreu y Mazzafera 2005).

En cultivo de células en suspensión de *Panax ginseng*, se ha demostrado que el H₂O₂ formado durante el estallamiento oxidativo y la acumulación de AJ endógeno participan en la producción de saponinas triterpénicas por el efecto del ácido oligogalacturónico (Hu *et al.*, 2003). Recientemente, la elicitación con AJ en cultivos de células en suspensión de *J. curcas* favoreció la acumulación de triterpenos pentacíclicos (lupeol y ácido betulínico) asociado al estrés oxidativo (Zaragoza-Martínez et al., 2016).

2. Justificación

En años recientes, las semillas de *J. curcas* han sido utilizadas principalmente en la producción de biodiesel y la parte aérea de la planta en la medicina tradicional, para tratar diversas enfermedades (malaria, leucemia, reumatismo y dolores musculares). Por análisis fitoquímicos se ha reportado que esta planta alberga diversos metabolitos secundarios y en el área foliar presenta un alto contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas. El metabolismo de estos compuestos se activa en respuesta a diversos factores abióticos, como el frío y el cambio osmótico. El uso de moléculas señal como jasmonatos también influyen en la acumulación de los flavonoides como una respuesta de defensa.

En el presente trabajo se estudió el efecto del estrés abiótico y del ácido jasmónico, de manera individual y en combinación, en plantas mexicanas de *J. curcas* (consideradas tóxicas y no tóxicas) sobre los cambios en su perfil metabolómico (flavonoides y antocianinas) y su relación con el sistema antioxidante.

3. Hipótesis

La exposición de plantas de *J. curcas* a bajas temperaturas activará la acumulación de flavonoides por la participación del ABA asociado al estrés oxidativo.

La aplicación exógena de AJ en plantas *J. curcas* provocará cambios en el perfil de flavonoides y antocianinas, así como un incremento en la respuesta antioxidante, incluso en plantas expuestas a bajas temperaturas y a estrés osmótico.

La adición de elicitores de origen abiótico inducirá la producción de triterpenos pentacíclicos en el cultivo de células en suspensión.

4. Objetivo General

Estudiar el efecto del estrés abiótico y biótico en *J. curcas* sobre el perfil de metabolitos secundarios (flavonoides, antocianinas y triterpenos), y su relación con el sistema antioxidante.

4.1 Objetivos Particulares

- Evaluar el perfil de flavonoides, marcadores de estrés oxidativo y la respuesta enzimática antioxidante en plantas de *J. curcas* durante un periodo corto de frío.
- Evaluar el papel del AJ en los niveles de antocianinas, flavonoides y, su relación con las enzimas antioxidantes en plantas de *J. curcas* expuestas a bajas temperaturas (5 °C) y estrés osmótico (sacarosa).
- Comparar el perfil de flavonoides, niveles de antocianinas y actividad de la PAL en plantas de dos variedades de *J. curcas* bajo el efecto del ácido jasmónico.
- Establecer el cultivo de brotes y células en suspensión de *J. curcas*.
- Evaluar el efecto de elicitores abióticos (H₂O₂, BSO, PEG) en la producción de triterpenos pentacíclicos en el cultivo de células en suspensión.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cultivo de plantas de *J. curcas*

5.1.1 Germinación y mantenimiento de variedades de *J. curcas*

Se utilizaron semillas de *J. curcas* variedad I-52 e I-Chiapas (tóxicas) y la variedad I-64 (no tóxica), las cuales fueron colectadas en el 2011 de las zonas agroecológicas del estado de Veracruz, y cuyas réplicas se encuentran localizadas en el Banco de Germoplasma del Colegio de Posgraduados, Campus Veracruz; fueron donadas por los Drs. Arturo Pérez Vásquez e Ivan Zavala del Ángel.

Las semillas fueron lavadas con agua y colocadas para su germinación en discos de peat moss (marca *vita*) en mini invernaderos, mantenidas en una cámara de crecimiento (Conviro Adaptis 1000) con fotoperiodo 16/8 en condiciones controladas de temperatura (30 °C) y humedad (60%). Una vez que se obtuvieron plántulas (con sus dos cotiledones), se sembraron en macetas con una mezcla de tierra negra:humus:agrolita:peat moss (1:0.5:0.5:0.5) y fueron mantenidas en las mismas condiciones. Las plantas de 4 semanas de edad se trasladaron a un invernadero bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo hasta que tuvieron 45 (variedad I-Chiapas) y 75 días (variedad I-52 e I-64). Las plantas fueron regadas cada tercer día al 50% de la capacidad de retención, para su mantenimiento.

5.1.2 Tratamiento de plantas con ácido jasmónico

Las plantas de *J. curcas* variedad I-52 e I-64 de 75 días de edad fueron tratadas con ácido jasmónico (AJ) para realizar dos experimentos de la siguiente manera: En un primer

experimento se utilizaron plantas de la accesión I-64, las cuales fueron divididas en cuatro grupos: un grupo control y tres grupos tratados con AJ en concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mM por 120 h de tratamiento. En el experimento 2 se consideraron plantas de las variedades I-52 e I-64, divididas en dos grupos para cada variedad, un grupo control y un grupo tratado con AJ 1 mM y fueron evaluadas después de 0, 12, 24, 72 y 120 h de tratamiento.

Para ambos experimentos las plantas fueron asperjadas con un volumen de 4 ml de una solución de etanol 30%, tritón X-100 al 0.05% (v/v) a las plantas control y ácido jasmónico preparada con etanol al 30%, plantas tratadas. Las plantas tratadas se mantuvieron separadas de las plantas control en invernadero (fotoperiodo 16/8 h, 30 °C). Se evaluó el efecto del ácido jasmónico en la acumulación de flavonoides, antocianinas y actividad de la PAL.

5.1.3 Exposición de plantas de *J. curcas* a una temperatura de 10 °C

Las plantas de *J. curcas* variedad I-Chiapas de 45 días crecidas en un invernadero a una temperatura de 30 °C y un fotoperiodo de 12/12 h fueron divididas en dos grupos: un grupo control (plantas crecidas a una temperatura 30 °C) y otro grupo de plantas que fueron transferidas a una cámara Conviron Adaptis-1000 programada con una temperatura de 10 °C y fotoperiodo de 12/12 h. Se evaluó el efecto del frío (temperatura de 10 °C) durante 0, 6, 12, 24 y 48 h donde se observaron los cambios morfológicos sobre el área foliar y marcadores de estrés (peróxido de hidrógeno y malondialdehído), actividad antioxidante enzimática (catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa) y no enzimática (α -tocoferol y flavonoides). En cada tratamiento se consideraron tres réplicas por tiempo de evaluación.

5.1.3.1 Experimento en hojas de la variedad I-Chiapas con ácido abscísico (ABA) y su exposición a una temperatura de 10 °C.

Con el objetivo de evaluar la relación del ABA entre los niveles de peróxido de hidrógeno y flavonoides cuando las plantas son expuestas a 10 °C, las hojas de plantas de la variedad I-Chiapas de 45 días de edad (mantenidas en un invernadero a 30 °C), se desprendieron y se colocaron de manera adaxial en cajas Petri con un volumen de 28 ml de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6. Las hojas se dividieron en dos grupos: un grupo sin ABA (-ABA) y otro grupo tratado con 100 µM de ABA (+ABA), posteriormente ambos grupos se incubaron por 24 h a una temperatura de 30 °C, en condiciones de oscuridad.

Después de las 24 h las cajas Petri se dividieron en cuatro tratamientos de la siguiente manera: 1) sin adición de ABA e incubadas a 30°C (-ABA 30 °C), 2) adición de ABA e incubadas a 30 °C (+ABA 30 °C), 3) sin la adición de ABA e incubadas a 10 °C (-ABA 10 °C) y 4) adición de ABA e incubadas a 10 °C (+ABA 10 °C), dejando el tratamiento por un periodo de 48 h. Transcurridas las 48 h se evaluó la detección *in situ* de peróxido de hidrógeno y la fluorescencia *in situ* de los flavonoides tomando dos réplicas por cada tratamiento.

5.1.4 Tratamiento con ácido jasmónico y exposición a temperatura de 5° C a las plantas de *J. curcas* variedad I-52

Se utilizaron plantas homogéneas de la variedad I-52 de 75 días de edad, para realizar tres experimentos de la siguiente manera: 1) las plantas fueron divididas en dos grupos: un grupo control (plantas mantenidas a 30 °C) y un grupo expuesto a una temperatura de 5 °C

en condiciones de oscuridad. Después de 48 h de tratamiento se evaluaron los cambios morfológicos y el índice de daño, el cual fue cuantificado en términos de malondialdehído.

2) El siguiente experimento consistió en el tratamiento de plantas con diferentes concentraciones de AJ con el objetivo de elegir una concentración óptima de AJ, que presentará bajos niveles de malondialdehído (MDA). Se consideraron plantas control en este caso, a las plantas expuestas a una temperatura de 5 °C por 48 h y plantas tratadas, plantas asperjadas con una solución de AJ en concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mM por 24 h en condiciones de oscuridad previo a su exposición al frío (5 °C).

3) En el experimento 2, la concentración de AJ 1.0 mM fue seleccionada para un nuevo experimento el cual fue dividido en cuatro tratamientos: 1) control (C), 2) tratamiento con AJ (AJ), 3) exposición al frío (5°C) y 4) tratamiento con AJ y exposición al frío (AJ + 5°C). En todos los tratamientos las plantas fueron mantenidas 24 h en condiciones controladas (30°C) y en oscuridad. Las plantas control (C) y expuestas a frío (5° C) fueron asperjadas con etanol al 30% (v/v). Los tratamientos AJ y AJ+5°C fueron tratados con 1 mM de AJ.

Después de 48 h de tratamiento se evaluaron los niveles de peróxido de hidrógeno y la respuesta antioxidante (actividad enzimática de catalasa y ascorbato peroxidasa; niveles de α -tocoferol, flavonoides y antocianinas). Los 3 experimentos fueron realizados por triplicado.

6.1.5 Tratamiento con ácido jasmónico y sacarosa

Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés osmótico inducido por sacarosa en las variedades I-52 e I-64, las áreas foliares de las plantas fueron asperjadas con 0, 75, 150 y 300 mM de sacarosa. La sacarosa fue disuelta en agua más tritón X-100 al 0.05% (v/v). La

concentración de sacarosa y variedad de planta fue seleccionada en base a la concentración más alta de antocianinas.

Posteriormente se realizó otro experimento el cual se dividió en cuatro tratamientos: 1) tratamiento con etanol 30% (v/v) (C), 2) tratamiento con 1 mM de AJ (AJ), 3) tratamiento con etanol 30% (v/v) y 300 mM de sacarosa y 4) tratamiento de 1 mM de AJ y 300 mM de sacarosa (AJ + sacarosa) concentraciones seleccionadas en experimentos previos. Después de 120 h de tratamiento bajo condiciones controladas (fotoperiodo 16/8 h; HR 60%), las hojas fueron lavadas, colectadas y congeladas a -20 °C, para su evaluación. En cada tratamiento se consideraron tres réplicas y se evaluaron los niveles de peróxido de hidrógeno y la respuesta antioxidante (actividad enzimática de catalasa y ascorbato peroxidasa; niveles de α -tocoferol, flavonoides y antocianinas)

5.2 Extracción, identificación y cuantificación de metabolitos secundarios

5.2.1 Flavonoides

5.2.1.1 Extracción por hidrólisis ácida

El material vegetal liofilizado (200 mg) fue extraído con metanol, sonicado y centrifugado a 3000 rpm. El extracto metanólico fue filtrado y concentrado a presión reducida en un rotavapor a 60 °C. El extracto fue disuelto en 1 ml de metanol: solución amortiguadora de fosfatos (90 mM) a pH 6. Se utilizaron 500 μ l del extracto metanólico: solución amortiguadora de fosfatos (90 mM) y entonces fue hidrolizado a 90 °C por 60 minutos con 500 μ l de HCl (4M) y butil hidroxitolueno (BHT) en una concentración de 9 μ M. Los hidrolizados fueron extraídos tres veces con 500 μ l de acetato de etilo. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro y evaporada con un flujo de nitrógeno (N₂ gas).

5.2.1.2 Cuantificación por método AlCl_3

El contenido de flavonoides totales fue determinado usando el método colorimétrico de acuerdo a Chang et al. (2002). El extracto hidrolizado (0.5 ml) fue mezclado con 1.5 ml de etanol, 0.1 ml de tricloruro de aluminio al 10%, acetato de potasio 1 M (0.1 ml) y agua destilada (2.8 ml). Las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 415 nm, usando un espectrofotómetro (Beckman DU @series 700 UV/vis). La quercetina fue usada para realizar la curva de calibración. El cálculo de flavonoides totales del extracto ácido fue reportado como μg equivalentes a quercetina/g PS.

5.2.1.3 Cuantificación de vitexina, isovitexina, apigenina y kaempferol por HPLC

EL extracto de hojas de *J. curcas* fue utilizado para confirmar la presencia de vitexina, isovitexina, apigenina y kaempferol por análisis de HPLC. La cuantificación de los flavonoides fue determinada por HPLC Varian ProStar 333 (Varian, Berkeley, CA) con detector de UV con arreglo de diodos (DAD) equipado con una columna Waters C18 de fase reversa (250 mm x 4.6 mm, 5 μm). El sistema de solventes y las condiciones de operación son las descritas por Liu et al., (2010) con ligeras modificaciones. La fase móvil consistió en metanol (solvente A) y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua (solvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 33% de A (0-10 min) seguido por 33-65% de A (10-30 min), 65-80% A (30-40 min), 90% A (40-50 min) y 80-33% B (50-60 min) a un flujo de 1 ml min^{-1} a 25 °C y el volumen de inyección fue de 100 μl . La detección de vitexina, isovitexina, apigenina y kaempferol fue a 330 nm. Los picos de los flavonoides fueron identificados por la comparación del tiempo de retención y espectros UV de los estándares. El tiempo de retención de los flavonoides fue de vitexina (17.12 min), isovitexina (23.71 min), kaempferol (31.89 min) y apigenina (32.59 min). La

cuantificación de los flavonoides fue mediante el uso de apigenina y kaempferol como compuesto de referencia para determinar la curva de calibración. La curva de calibración fue realizada en un intervalo de 0 a 1.77 μg de apigenina ($y=37364x-339.25$, $R^2=0.99$) en metanol: DMSO (7:3) e intervalo 0-7.11 μg de kaempferol ($y=15158x-255.25$, $R^2=0.99$) en metanol. Todos los análisis fueron realizados por triplicado. Los resultados son expresados como la media de los valores en $\mu\text{g/g}$ PS.

5.2.1.4 Localización *in situ* de flavonoides

Para la tinción de flavonoides, secciones de hojas (1 mm) fueron sumergidas en una solución de 2-aminoetil difenilborinato (DPBA) 0.25% p/v con 0.05% de tritón X-100 por 15 min a temperatura ambiente (Peer et al., 2001). La fluorescencia en las secciones foliares fue visualizada con un microscopio Carl Zeiss equipado con epifluorescencia con un filtro FITC (excitación 450-490 nm, supresión LP 515 nm). Una cámara Sony Cyber-shot profesional fue utilizada en la toma de micrografías epifluorescentes. La fluorescencia fue determinada por el uso del programa Image J v. 1.45 para Windows. Los valores obtenidos fueron calculados usando la siguiente fórmula: fluorescencia del área seleccionada (FAS) = densidad de integración - área foliar seleccionada \times promedio de la fluorescencia del fondo de la imagen. Los valores obtenidos de FAS son reportados como % de intensidad de fluorescencia relativa con respecto al control.

5.2.2 Antocianinas

5.2.2.1 Extracción y cuantificación

Las antocianinas fueron extraídas de 0.5 g de hoja de acuerdo al procedimiento descrito por Ronchi et al. (1997) con modificaciones menores. Las hojas fueron maceradas con 1

ml de ácido clorhídrico (HCl) al 1% (v/v) en metanol frío a 4°C. El extracto de metanol acidificado fue incubado a 4 °C en condiciones de oscuridad. Al extracto recuperado se le adicionaron 300 µl de agua destilada, 500 µl de cloroformo y se mezcló para remover las clorofilas presentes en el extracto. El contenido de antocianinas en la fase acuosa fue recuperado y la absorbancia fue leída a 530 nm (A_{530}). El contenido de antocianinas fue expresado en µg/g PS usando el peso molecular (449.2 g/mol) y coeficiente de extinción ($26\ 900\ \text{L cm}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$) de cianidina 3-glucósido.

5.2.2.2 Extracción por hidrólisis ácida y purificación con columnas C18 para análisis por HPLC

Las antocianinas fueron extraídas a partir de 2g PF de hojas (plantas de 1 año y 30 días) previamente maceradas, utilizando 10 ml de metanol acidificado (0.5% de HCl) a 4 °C por 1 h en condiciones de oscuridad. De igual manera se realizó la extracción de antocianinas al concentrado de uva (usando 1.5 ml). Ambos extractos por separado fueron filtrados en un embudo Buchner usando papel Whatman N° 1. Los extractos fueron evaporados a 60°C en un rotavapor. Cada extracto fue disuelto en 600 µl de 0.02% de HCl en solución acuosa.

La purificación de las antocianinas consistió en una extracción en fase sólida mediante la aplicación de una columna Waters C18 (Sep-Pak) de acuerdo al procedimiento de Durst y Wrolstad (2001). La columna inicialmente fue activada con dos volúmenes de 3 ml de metanol y 0.02% de HCl en solución acuosa. Una alícuota de 600 µl del extracto de hoja y uva, fueron cargados a sus respectivas columnas; llevando los siguientes pasos de elución: 1) 6 ml de HCl 0.02% en solución acuosa fue adicionado para remover otros compuestos polares como azúcares y aminoácidos; 2) tres volúmenes de 3 ml de acetato de etilo fueron adicionados para eliminar clorofilas y compuestos fenólicos y 3) finalmente, las

antocianinas retenidas en la columna fueron eluidas con una solución metanólica-0.05% de HCl. La solución eluida fue evaporada con flujos de N₂ gaseoso hasta obtener un volumen de 1 ml.

Posteriormente, se adicionó 3 ml de HCl 6 M (modificado de Macz-Pop et al., 2006) a un volumen conocido de extracto purificado de hojas (1 ml) y uva (0.5 ml); estos extractos fueron transferidos a un baño maría por 1 y 2 h a 95 °C, respectivamente. Después de este periodo, se enfriaron las muestras y se repitió el método de purificación señalado anteriormente. Las muestras de los extractos se disolvieron en 500 µl de ácido fosfórico al 4% para ser analizadas por HPLC.

5.2.2.3 Identificación de antocianinas por HPLC

Las agliconas de antocianinas presentes en el extracto hidrolizado y purificado fueron identificadas mediante el uso de HPLC (Varian Prostar 330) con detector de UV y arreglo de diodos (DAD) equipado con una columna Waters C18 de fase reversa (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). La fase móvil consistió en acetonitrilo (solvente A), y una solución de 10% ácido acético, 5% acetonitrilo y 1% ácido fosfórico (Solvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 95% de B a 0 min, 80% de B por 20 min y 95% de B por 5 min a un flujo de 1ml por min⁻¹ a 25° C y el volumen de inyección fue de 100 µl. La detección de las antocianinas fue a 520 nm. Los picos de las antocianinas fueron identificados por la comparación de tiempos de retención y espectros de UV del extracto hidrolizado y purificado de uva, así mismo se realizó el método de adición de ambos extractos para su confirmación.

5.2.3 Triterpenos

5.2.3.1 Extracción y cuantificación de lupeol, betulina y ácido betulínico por HPLC

Se utilizaron partes de la planta (tallos, peciolo, hoja) y células; se congelaron con nitrógeno líquido, se pulverizaron con ayuda de mortero y se liofilizaron. Las partes de la planta (0.2 g) y células liofilizadas (0.1 g) fueron extraídas dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas fueron combinadas y evaporadas a sequedad al vacío. Los residuos fueron disueltos en 100 y 600 µl de metanol para su posterior análisis por HPTLC y HPLC, respectivamente.

Análisis de HPLC: La solución (hoja y células) fue filtrada a través de una membrana de nylon (0.25 µm) e inyectada (30 µl) en el equipo de HPLC (Varian Chromatograph ProStar 333) equipado con detector de arreglo de diodos (Varian, Walnut Creek, CA) usando una columna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb 5 mm, ODS de 250 mm de longitud x 4.6 mm i.d.). La elución de las muestras fue realizada utilizando una mezcla de metanol-agua 90:10 con un flujo de 0.7 ml min⁻¹, detectando los compuestos a 250 nm. Los tiempos de retención de los triterpenos fueron ácido betulínico 9.8 min, betulina 13.4 min y lupeol 22.5 min. La curva de calibración fue realizada en un intervalo lineal de 0-15 µg de Lu en metanol ($y=9804.2x-6622.2$, $R^2= 0.98$). Los resultados fueron expresados como la media de los valores en µg/g PS.

5.3 Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)

Para la identificación de metabolitos secundarios, se utilizaron placas HPTLC de silicagel (Merck®; 60 UV F₂₅₄, 5x5 cm) y como fase móvil una serie de mezclas (Tabla 5) para la identificación de flavonoides, antocianinas y triterpenos. Después de aplicar el revelador, se realizó un calentamiento durante un minuto y 30 s con la ayuda de una secadora de cabello. Las placas fueron analizadas a simple vista y con una lámpara de luz ultravioleta a 366 nm. El valor de *R_f* de los compuestos de importancia fue determinado mediante la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{L_c}{L_s}$$

L_c: longitud que recorrió cada compuesto desde la zona de aplicación de la muestra hasta el frente del solvente.
L_s: longitud que recorrió el solvente desde la zona de aplicación de la muestra hasta el frente del solvente.

5.3.1 Flavonoides

Para la identificación de fenoles y flavonoides se utilizaron alícuotas de 10 µl del extracto hidrolizado de raíz, tallo y hoja. Los extractos fueron punteados en placas de HPTLC, eluídas y reveladas de acuerdo a la Tabla 5. Los compuestos de importancia fueron identificados por los *R_f* de los estándares de ácido ferúlico (*R_f* 0.83), quercetina (*R_f* 0.78), apigenina (*R_f* 0.78) y kaempferol (*R_f* 0.76) vitexina (*R_f* 0.40) e isovitexina (*R_f* 0.31, valor de *R_f* reportado por Wang et al., 2010), después de ser revelados con DPBA al 1% en metanol y polietilenglicol (PEG-3350) al 5% en etanol y observados a UV-366 nm.

Tabla 5. Fases móviles y reveladores utilizados en la identificación de flavonoides, antocianinas y triterpenos.

Tipo de metabolito	Fase móvil	Revelador*
Fenoles y flavonoides	^a Tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: agua (16:8:2:1)	2-aminoetil difenilborinato (DPBA) al 1% en metanol y PEG-3350 al 5% en etanol
	Hexano: acetona (1:4)	
Antocianinas	^b BAW: n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5)	
Triterpenos	Hexano: acetona (4:1)	<i>p</i> -anisaldehído-H ₂ SO ₄

^a Fase móvil reportada por Wang et al., 2010. ^bFase móvil reportada por Harborne (1967). *Reveladores reportados por Wagner y Bladt (1996).

5.3.2 Antocianinas

La identificación de las antocianinas presentes en el extracto hidrolizado fue de la siguiente manera: alícuotas de 15 µl fueron punteadas en placas de HPTLC y eluidas con n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) fueron detectadas a simple vista. Los compuestos fueron identificados por los valores de *R_f* de las antocianinas reportados por Harborne (1967) (Tabla 6).

5.3.3 Triterpenos

La identificación de triterpenos se realizó a partir de extractos orgánicos de tallo, peciolo y hojas. Una alícuota de 10 µl de extracto orgánico (acetato de etilo) fue utilizada para el análisis de triterpenos en placas de HPTLC; esta fue desarrollada con hexano: acetona 4:1. El triterpeno en los extractos fue identificado por el *R_f* del estándar de lupeol (*R_f* 0.51), después de secar y revelar la placa con *p*-anisaldehído-H₂SO₄. Los valores relativos del triterpeno en los extractos fueron obtenidos por el programa Just TLC v. 4.0.3 para Windows.

Tabla 6. *Rf* de antocianinas utilizando la fase móvil BAW (4:1:5) según Harborne (1967).

Compuesto	Rf
Pelargonidina 3-glucósido	0.44
Cianidina 3-glucósido	0.38
Peonidina 3-glucósido	0.41
Delfinidina 3-glucósido	0.26
Petunidina 3-glucósido	0.35
Malvidina 3-glucósido	0.38
Pelargonidina	0.80
Cianidina	0.68
Peonidina	0.71
Delfinidina	0.42
Petunidina	0.52
Malvidina	0.58

BAW: n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

5.4 Extracción y cuantificación de α -tocoferol

El α -tocoferol fue extraído a partir de 0.2 g de hoja en peso fresco (g PF), la cual fue homogenizada con 2 ml de acetona fría (4°C) con ayuda de mortero y pistilo. La fase orgánica fue recuperada en un tubo y posteriormente fue fraccionada con 0.5 ml de hexano, homogenizando y mezclando con vortex por 30 segundos, y posteriormente colocado en baño de hielo para lograr la separación de fases. Se recuperó la fase oleosa (inferior), la cual contenía el α -tocoferol.

La cuantificación de α -tocoferol fue realizada de acuerdo con Kanno e Yamauchi, (1977), de la siguiente manera. A 0.2 ml de la fase oleosa (α -tocoferol) se le adicionó 0.4 ml de 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (PDT) al 0.1% (p/v); se aforó a 3 ml usando etanol absoluto y posteriormente 0.4 ml de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 0.1% (p/v) fue

adicionado y mezclado, incubando 4 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo se le añadió 0.2 ml de ácido ortofosfórico 0.2 M, se mezcló y se dejó reaccionar por 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 554 nm. Se cuantificó utilizando una curva estándar en un intervalo lineal de 0-80 μmol realizada con α -tocoferol (Vitamina E Sigma Chemical Co) y el contenido fue expresado como $\mu\text{mol/g}$ PS.

5.5 Indicadores de respuesta oxidante

5.5.1 Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Los niveles de H_2O_2 fueron determinados de acuerdo a Velikova et al. (2000). Las muestras (0.5 g PF) fueron congeladas y maceradas con nitrógeno líquido, y homogenizadas con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1% (p/v). El homogenizado se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4°C y a 0.5 ml del sobrenadante se le adicionó 0.5 ml de regulador de fosfatos de potasio 10 mM (pH 7.0) y 1 ml de yoduro de potasio 1 M para iniciar la reacción. La absorbancia fue medida a 390 nm y se cuantificó el H_2O_2 con base en una curva estándar y se expresó en $\mu\text{mol/g}$ PS.

5.5.2 Detección histoquímica de H_2O_2 *in situ*

La detección de H_2O_2 en las hojas de *J. curcas* fue mediante el uso de 3,3'-diaminobencidina (DAB) disuelto en una solución reguladora de fosfatos de potasio (10 mM, pH 7.8) (Shi et al., 2010). Las hojas se sumergieron en una solución de 1 mg ml^{-1} de DAB (pH 4) e incubadas a temperatura ambiente en oscuridad por 24 h. Las hojas fueron decoloradas con etanol al 96% y conservadas en glicerol: etanol (1:4 v/v). El área de color café o marrón se midió utilizando el programa Image J v. 1.45 para Windows y se expresó como el porcentaje (%) de área de acumulación de H_2O_2 .

5.5.3 Determinación de malondialdehído

El nivel de peroxidación lipídica fue medido con base en la cantidad de malondialdehído (MDA) generado, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un aducto color rojo (TBA-MDA), el cual tiene un máximo de absorbancia a 532 nm (Heath y Packer 1968). Hojas (0.3 g PF) fueron homogenizadas con 2 ml de TCA al 0.1% (v/v) en un mortero previamente enfriado a 4°C. El homogenizado fue centrifugado a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y 1 ml del sobrenadante fue adicionado a un tubo de ensayo que contenía 1 ml de TBA al 0.5% (p/v) y 5 µl de butilhidroxitolueno (BHT) al 3.75% (p/v). La mezcla fue agitada vigorosamente y calentada a 95°C en baño María por 30 min, y enfriada en un baño de hielo. La determinación de la absorbancia fue realizada a 532 y 600 nm. Los valores de DO600 se restaron de los valores a 532 nm de los complejos MDA-TBA. La concentración de MDA fue calculada a través de una curva estándar utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), un precursor del MDA en concentraciones de 0 a 5 µmol. Las concentraciones fueron expresadas en µmol por gramo de peso seco (µmol/g PS).

5.6 Respuesta enzimática

5.6.1 Extracción y cuantificación de proteína

Las hojas (0.5 g PF) se maceraron con nitrógeno líquido en un mortero con polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP) al 2% (p/p) y se homogenizaron con 1 ml de regulador de extracción (regulador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 7.0; con EDTA 1 mM de). El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzimas. La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente utilizando el método de Peterson (1977) con

albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de proteína. La curva de calibración se realizó en un intervalo de 0 - 10 µg de proteína.

5.6.2 Actividad enzimática de catalasa

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) de cada uno de los extractos proteicos fue determinada de acuerdo a Montavon et al. (2007). La actividad fue medida en la mezcla de reacción conteniendo 1.8 ml de regulador de fosfatos, 50 mM (pH 7.0), 0.1 ml de H₂O₂ 2% (v/v), y 0.1 ml de extracto proteico, todo en un volumen final de 2 ml. El cambio de absorbancia a 240 nm fue seguido por tres minutos a temperatura ambiente. Una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para la descomposición de 1 µmol de H₂O₂ por minuto. La actividad fue reportada como unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg de proteína).

5.6.3 Actividad enzimática de ascorbato peroxidasa

La actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) fue determinada monitoreando el decremento de la absorbancia del ácido ascórbico a 290 nm por 3 min de acuerdo a Silva et al. (2010). La mezcla de reacción consistió en regulador de fosfatos de potasio 50 mM a pH 7.0, ácido ascórbico 0.5mM, H₂O₂ 30 mM y 0.1ml de extracto enzimático, en un volumen total de 2 ml incubado a 25°C. La actividad de la enzima fue calculada usando el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y expresada como unidades de actividad de enzima (oxidación de 1 µmol de ascorbato por minuto) por mg de proteína.

5.6.4 Actividad enzimática de Glutación reductasa

La actividad de glutación reductasa (GR) fue ensayada por el monitoreo de la disminución en la absorbancia a 340 nm por 3 min, debido a la oxidación del NADPH (Yin et al., 2008). La mezcla de reacción consistió en un regulador de fosfatos de potasio 50 mM (pH 7.0), 0.5 mM de glutación oxidado (GSSG), 0.1 mM de NADPH y 100 μ l de extracto de enzima. La actividad enzimática de GR fue calculada usando el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{340} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y expresada como una unidad de enzima (oxidación de 1 μ mol de NADPH por min) por mg de proteína.

5.7 Cultivo *in vitro* de *J. curcas*

El material vegetal fue obtenido de plantas de 2 años de edad o plántulas de 15 d de la variedad Chiapas (no tóxica) mantenidas en tierra con un fotoperiodo 16/8 en condiciones controladas (30 °C, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Este material fue proporcionado por la M. en C. Gabriela R. Luna Palencia. Los explantes, según el tipo de experimento fueron desinfectados mediante una limpieza de la superficie con agua jabonosa durante 5 min, posteriormente fueron tratados con etanol al 70% (v/v) durante 1 min e hipoclorito de sodio al 4% (v/v) con tritón (0.01% v/v) por 3 min. Posteriormente, estos fueron lavados 3 veces con agua desionizada estéril. El proceso de desinfección fue realizado en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Para los experimentos en la inducción de brotes y callos se consideró un fotoperiodo de 16/8 a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y un flujo de densidad de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

5.7.1 Obtención de cultivo de brotes

Para la inducción de brotes, los siguientes factores fueron evaluados: tipo de explante, orientación del cotiledón y tipo de medio. Los nodos de plantas adultas (2 años de edad) y los cotiledones de plántulas de 15 d (colocados de forma adaxial y abaxial) fueron cultivados en medio sólido, B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y el MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2.5 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y 1.5 μM de sulfato de cobre (CuSO_4). La fuente de carbono utilizada fue sacarosa al 3% y fitagel al 0.2%. El número de brotes por explante fue registrado después de 42 días.

El explante de cotiledon y el medio B5 fueron utilizados para probar otros fitoreguladores de la siguiente manera: BAP (2.5, 3.1 y 13.3 μM) solo y BAP 2.5 μM combinado con cinétina (Kn) (0.4 y 0.9 μM) y 2.3 μM de tidiazuron (TDZ), ácido indolbutírico (IBA) 0.9 μM en combinación con TDZ 2.3 y 0.9 μM . El medio basal B5 suplementado con 2.5 μM de BAP y 1.5 μM de CuSO_4 fue utilizado como control. Después de 42 días de cultivo se determinó el número de brotes por explante.

5.7.2 Obtención de cultivo de callos

La inducción de callos fue mediante el uso de hojas de plantas adultas (2 años de edad); se utilizaron los medios B5 y MS suplementados con 4.1 μM de ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico (Picloram) y 0.4% de polivinilpirrolidona (PVP). Los reguladores de crecimiento usados para obtener callos friables en el medio B5 fueron Picloram y ácido naftalenacético (ANA); los fitoreguladores se adicionaron al medio a partir de soluciones stock de 1 mg/ml, concentraciones de Picloram (2.1, 4.1 y 8.3 μM) en combinación con

ANA (2.7 y 5.4 μM). La fuente de carbono utilizada en los experimento fue sacarosa al 2% y fitagel al 0.2 %. Los callos fueron subcultivados cada dos semanas.

5.7.3 Obtención de cultivo de células en suspensión de *J. curcas*

Para el inicio de las suspensiones celulares se transfirieron aproximadamente 2 g de callo friable a matraces de 250 ml con 50 ml de medio líquido B5 con 2% de sacarosa, Picloram y ANA (Tabla 7; medio Jc-1 y medio Jc-2) a un pH de 5.8. Los matraces se incubaron a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ a 110 rpm en condiciones de oscuridad y los cultivos (por duplicado) fueron resembrados cada 10 días.

Tabla 7. Combinación de reguladores de crecimiento adicionados al medio B5.

Medio	Reguladores de crecimiento (μM)	
	Picloram	ANA
Jc-1	4.1	2.7
Jc-2	8.3	5.4

5.7.4 Evaluación del cultivo en suspensión de *J. curcas* bajo el efecto de elicitores abióticos

Se utilizó la línea celular de *J. curcas* establecida en este trabajo de investigación; mantenida en el medio B5 con 2% de sacarosa, 4.1 μM de Picloram y 2.7 μM de ANA (medio Jc-2) bajo las condiciones establecidas. Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio Jc-2 fueron inoculados al 10% (p/v) con células de 7 días de edad, las cuales fueron separadas del medio de cultivo mediante filtración.

Una vez que los cultivos alcanzaron los 7 días de edad se adicionaron los elicitores de manera individual bajo condiciones de esterilidad para llegar a las concentraciones siguientes: PEG (5, 10 y 15% p/v del medio en el matraz), H_2O_2 (200, 400 y 600 μM), BSO (200, 400, 600, 800 μM); un siguiente experimento se llevó a cabo por la adición combinada de BSO 600 μM - H_2O_2 (200 y 400); evaluando la producción de triterpenos en todos los tratamientos (n=2) después de 120 h después de la elicitación.

5.8 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados por medio de un ANOVA de una y dos vías. Todos los datos fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DE). La significancia estadística fue evaluada con la prueba de Tukey con un nivel de $P < 0.05$. Todas las pruebas fueron realizadas con el programa SPSS v 20.0 para Mac.

6. Resultados y discusión

6.2 Identificación de fenoles y flavonoides en diferentes tejidos de *J. curcas*

Para identificar los grupos de compuestos en diferentes tejidos de *J. curcas* se realizó un análisis de los extractos usando cromatografía en capa fina (HPTLC). Los extractos de diferentes tejidos de plantas (Figura 5) cultivadas bajo condiciones controladas en invernadero (fotoperiodo 16/8; temperatura 30 °C y humedad 60%), mostraron zonas fluorescentes a 366 nm después de reaccionar con PEG-3350 y DPBA, dando fluorescencia azul, amarilla y verde-amarillento, lo cual sugiere la presencia de fenoles y flavonoides respectivamente (Wagner y Bladt, 1996).

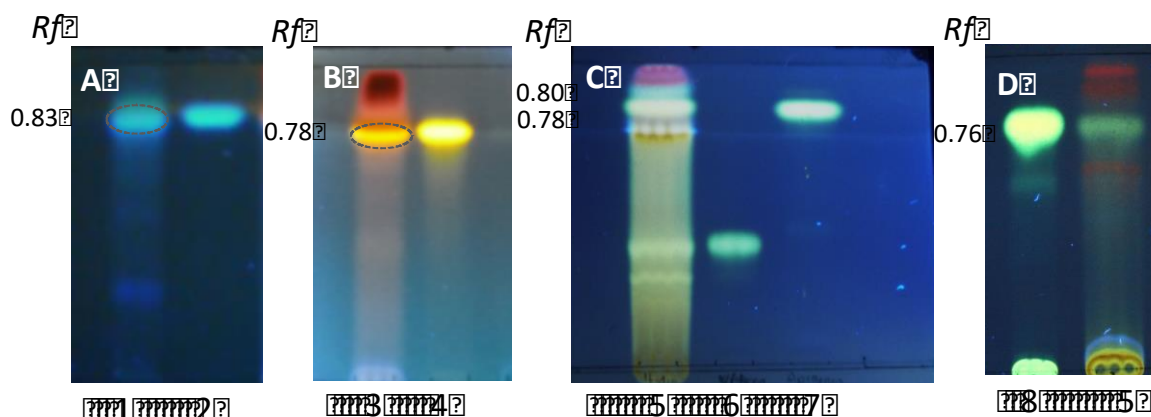


Figura 5. HPTLC (366 nm) de extractos hidrolizados de diferentes tejidos de *J. curcas* variedad I-64. Placas de HPTLC sílice 60 F₂₅₄ desarrolladas en dos sistemas de elución: (A-C) fase móvil tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: agua (16:8:2:1) y (D) hexano: acetona (1:4); reveladas con PEG-3350 y DPBA. (A, 1) raíz; (B, 3) tallo; (C y D, 5) hoja. Estándares: ácido ferúlico (2), quercetina (4), vitexina (6), apigenina (7) y kaempferol (8). Los valores de *Rf* de los estándares característicos de las muestras son señalados a la izquierda de cada placa de HPTLC.

La Tabla 8 presenta los *Rf* de los principales fenoles y flavonoides identificados en los diferentes tejidos de *J. curcas* variedad I-64 por análisis de HPTLC.

Tabla 8. Valores de *R_f* de fenoles y flavonoides en diferentes tejidos de *J. curcas* variedad I-64.

Tejido	Compuestos	<i>R_f</i>	Color de compuesto a 365 nm
Raíz	Ácido ferúlico	0.83 ^a	Azul
Tallo	Quercetina	0.78 ^a	Amarillo
	Apigenina	0.78 ^a	Verde amarillento
Hoja	Kaempferol	0.80 ^a , 0.76 ^b	Verde amarillento
	Vitexina	0.40 ^a	Verde amarillento
	Isovitexina	0.31 ^a	Verde amarillento

^aFase móvil: tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: agua (16:8:2:1) y ^bFase móvil hexano: acetona (1:4).

En la raíz fue posible la identificación de ácido ferúlico y en el tallo quercetina (Figura 5A y B). Además, los dos sistemas de elución utilizados (Figura 5 C y D) permitieron la identificación de vitexina, apigenina y kaempferol en las hojas de plantas de 75 d (variedad I-64). Los extractos de diferentes tejidos de plantas infestadas por ácaros mostraron la presencia de flavonoides y fenoles, donde los extractos de hojas y tallos (Anexo, Figura 2, carril 5 y 7) se caracterizaron por presencia de la vitexina y apigenina, mientras que en la raíz solo se identificó el ácido gálico (Anexo, Figura 2, carril 8).

En la Figura 6 se encuentra el perfil de flavonoides en hojas de *J. curcas* variedad I-64, donde se utilizó un sistema de gradiente para la separación de tres flavonas y un flavonol. Los picos de las flavonas identificadas correspondieron a vitexina (pico **1**, $t_R = 17.12$ min), isovitexina (pico **2**, $t_R = 23.71$ min), apigenina (pico **4**, $t_R = 32.59$ min), mientras que el pico **3**, $t_R = 31.89$ min fue identificado como kaempferol (flavonol). Estos flavonoides fueron identificados por el tiempo de retención, espectro de UV comparado con los compuestos de referencia (Anexo, Figura 3).

Los resultados obtenidos por HPTLC y HPLC son comparables con los análisis fitoquímicos de hojas de *J. curcas*, donde revelan la presencia de vitexina, isovitexina,

apigenina y kaempferol como los principales constituyentes químicos (Kumar y Sharma, 2008; Rejila et al., 2012; Huang et al., 2014).

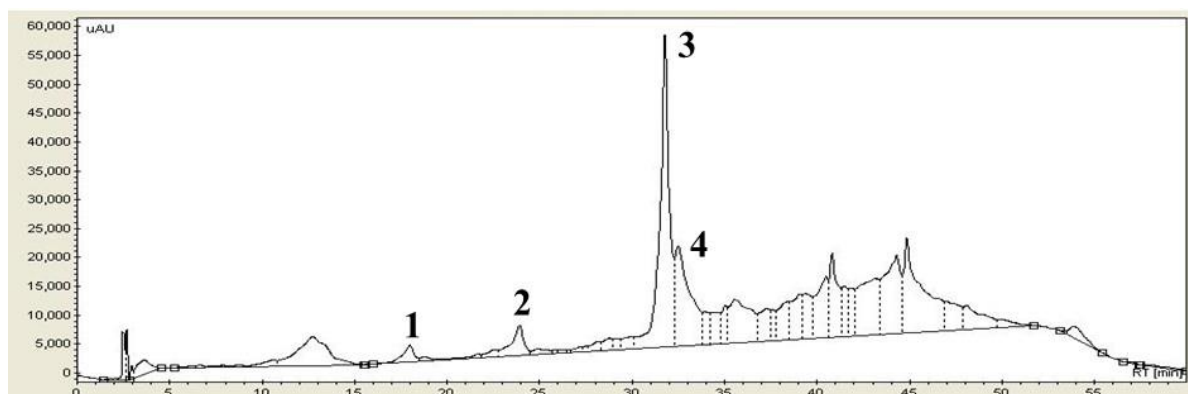


Figura 6. Cromatograma del perfil de flavonoides en hojas de *J. curcas* variedad I-64 obtenido luego de la separación por HPLC, utilizando como fase móvil metanol y 0.1% TFA en agua en un sistema por gradiente de acuerdo a Liu et al. (2010); detectados a 333 nm. Vitexina (**1**, $t_R = 17.12$ min), isovitexina (**2**, $t_R = 23.71$ min), kaempferol (**3**, $t_R = 31.89$ min) y apigenina (**4**, $t_R = 32.59$ min).

6.2 Cambios en los marcadores de estrés oxidativo y en la respuesta antioxidante en plantas de *J. curcas*, variedad Chiapas expuestas a un periodo corto de frío (10 °C)

Se monitorearon los síntomas de daño en el área foliar y el contenido de MDA de las plantas de *J. curcas* variedad I-Chiapas (tóxica) de 45 d durante 48 horas a 10 °C con un fotoperiodo de 12/12 (Figura 7A y B). Los síntomas de daño de las plantas durante la exposición a 10 °C fueron evidentes en el área foliar (Figura 7A) principalmente las hojas, las cuales cambiaron de color verde oscuro a verde pálido.

Durante las primeras 12 h (Figura 7A) de exposición al frío, las hojas de las plantas presentaron dobleces y 48 h después se observó un ligero enrollamiento y marchitez (Figura 7A). Cabe destacar que algunas plantas (n=3) presentaron una ligera recuperación 24 h después de su exposición a 10 °C. Sin embargo, se ha reportado que principalmente cultivos de las familias Solanaceae, Cucurbitaceae, Poaceae y Anacardiaceae de origen tropical y subtropical expuestas a baja temperatura sufren alteraciones metabólicas y fisiológicas, lo que conlleva a la manifestación de daños morfológicos en la planta (Allen y Ort 2001).

La exposición de las plantas a bajas temperaturas (< 12 °C) frecuentemente provoca daños a nivel de membrana por la activación de la peroxidación lipídica (Campos et al., 2003). El MDA, producto de la peroxidación lipídica, es un indicador importante del daño en las membranas y la afectación del metabolismo celular (Apel y Hirt 2004; Posmyk et al 2005). Por tal razón, se evaluaron los niveles de MDA de las hojas de las plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas durante su exposición a 10 °C (Figura 7B).

Los niveles de MDA en las plantas control se mantuvieron entre 15.9 y 18.37 $\mu\text{mol/g PS}$. En las plantas expuestas a 10 °C se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) de 24.53 $\mu\text{mol/g PS}$ en 12 h y en 48 h alcanzó 28.66 $\mu\text{mol/g PS}$. En este punto (48 h) los

niveles de MDA fueron 1.76 veces más altos comparado a los niveles de las plantas control.

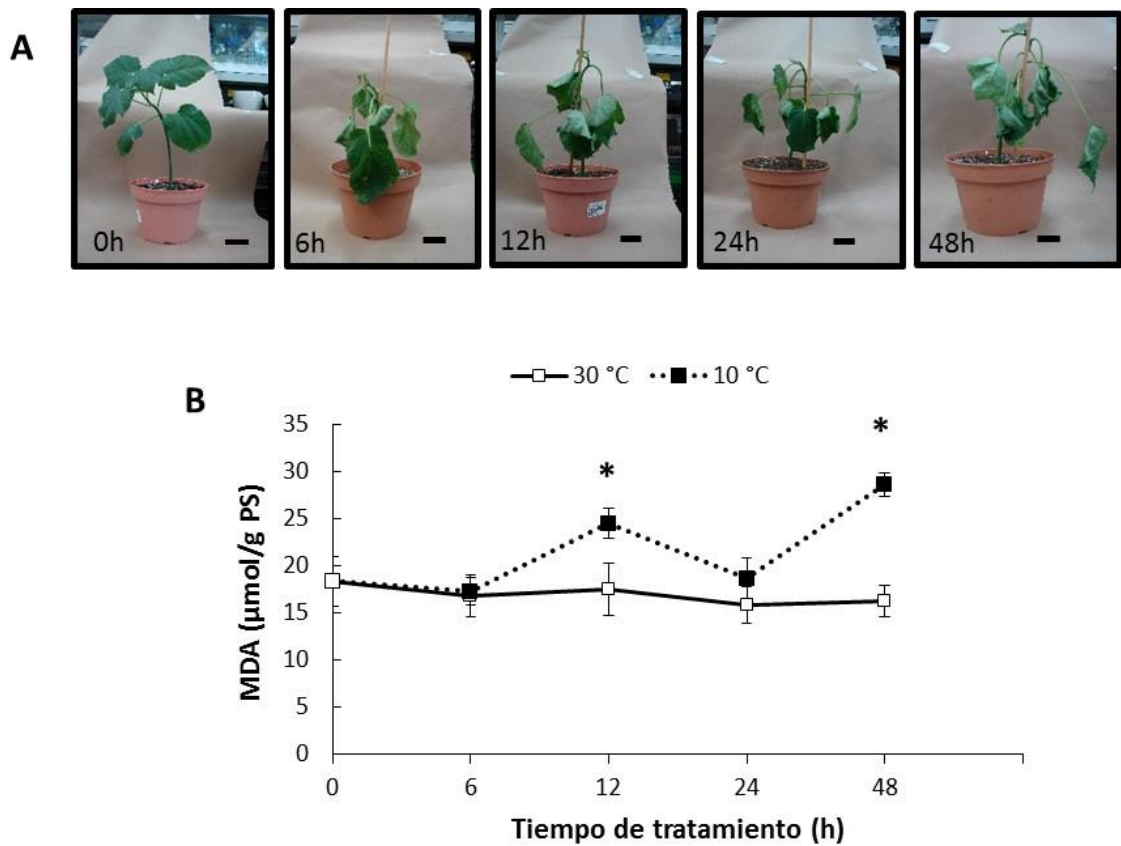


Figura 7. Plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuesta a 10 °C en fotoperiodo (12/12) durante 48 h. A. Síntomas de daño en el área foliar. B. Contenido de MDA. Las plantas mantenidas a 30 °C y fotoperiodo (12/12) fueron consideradas tratamiento control. Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre las plantas expuestas a 30 °C y 10 °C de acuerdo al estimador Tukey.

Las reacciones de lipoxidación conducen a la afectación de la composición lipídica y estabilidad de la membrana celular, lo cual es característico de especies no tolerantes a bajas temperaturas (Campos et al., 2003). *J. curcas* en estado de planta (1 mes 15 d) ha sido considerada una planta relativamente no tolerante al frío (4 °C) (Liang et al., 2007). La

exposición de plantas de *J. curcas* a 10 °C mostraron después de 12 h un incremento en la concentración de MDA de 3.4 veces y una disminución de la tasa fotosintética en un 65% sugiriendo que la estabilidad de la membrana ha sido dañada como resultado del estrés oxidativo (Zheng et al., 2009; Gao et al., 2013).

Los niveles de H₂O₂ en hojas de plantas de la variedad I-Chiapas de *J. curcas* sometidas a 10 °C incrementaron en comparación a las plantas control (Figura 8). La concentración de H₂O₂ en las plantas control (Figura 8A) varió entre 482 y 574 µmol/g PS. En las plantas expuestas a 10 °C se observó a las 12 h un ligero incremento de H₂O₂ de 1.18 veces comparado al control. En 24 h los niveles de las plantas expuesta a frío mostraron niveles de H₂O₂ similares al control pero al final del tratamiento (48 h) alcanzó una producción significativa de 1.4 veces mayor (de 574.34 ± 23.47 µmol/g PS a 806.28 ± 51.03 µmol/g PS) comparado con las plantas control (Figura 8A).

Para analizar *in situ* la producción de H₂O₂ en las plantas expuestas a 30 °C y 10 °C, las hojas fueron desprendidas y sumergidas en una solución de DAB. Después de 12 h con DAB, las hojas control (30 °C) presentaron una coloración café tenue en el mesófilo y venas de las hojas (Figura 8B). Las hojas de las plantas expuestas a 10 °C mostraron una mayor intensidad y distribución de un precipitado café (Figura 8B, 10 °C) que se acumuló principalmente en el mesófilo de las hojas.

Estos resultados sugieren que la producción de H₂O₂ en respuesta al estrés por baja temperatura es producida específicamente por las células del mesófilo. Resultados semejantes han sido reportados por Pastori et al. (2000), donde encontraron que la mayor distribución de H₂O₂ ocurre en las células del mesófilo en comparación con las células del haz de la vaina de las plantas de *Zea mays* v. H99, cuando estas fueron expuestas a bajas temperaturas.

La actividad de CAT, APX y GR de las plantas expuestas a 10 °C fue medida durante 48 h y es presentada en la Tabla 9. Durante las primeras 24 h, la actividad de la CAT en las plantas control y expuestas a 10 °C fue semejante, pero al final del tratamiento (48 h) está fue 2.6 veces más alta en las plantas expuestas a baja temperatura (10 °C) (Tabla 9). La actividad de la APX y GR en las plantas expuestas a 10 °C por 6 h mostró un aumento significativamente alto ($P < 0.05$) hasta el final del tratamiento (48 h) en relación a las plantas control. Es así que la actividad de la APX incrementó 2.5 veces (de 20.30 ± 1.12 U/mg proteína en el control a 51.44 ± 1.95 U/mg proteína) y la actividad de la GR fue 4.1 veces superior después de 48 h de tratamiento (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad de CAT, APX y GR en las hojas de plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuestas durante 48 h a 10 °C.

Tratamiento	Enzimas	Tiempo de tratamiento (h)				
		0	6	12	24	48
30 °C	CAT	1.37 ± 0.83	0.28 ± 0.07	1.89 ± 0.93	1.53 ± 0.23	1.88 ± 0.81
	APX	17.94 ± 2.66	14.92 ± 1.00	18.69 ± 2.38	47.72 ± 1.63	20.30 ± 1.12
	GR	7.39 ± 0.63	8.28 ± 1.45	11.39 ± 1.55	11.41 ± 2.56	7.47 ± 2.00
10 °C	CAT	-	$0.47 \pm 0.21^*$	3.04 ± 0.64	1.90 ± 0.64	$4.86 \pm 0.66^*$
	APX	-	$28.86 \pm 2.12^*$	$59.33 \pm 1.75^*$	49.15 ± 1.87	$51.44 \pm 1.95^*$
	GR	-	$13.11 \pm 1.23^*$	$39.02 \pm 2.26^*$	$19.87 \pm 1.65^*$	$30.34 \pm 1.14^*$

Las plantas mantenidas a 30 °C con fotoperiodo (12/12) fueron consideradas tratamiento control. La actividad enzimática es referida a U/mg proteína. CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa y GR: glutatión reductasa. Los valores promedio con * representan diferencias significativas para cada tiempo evaluado entre los tratamiento control y 10 °C de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

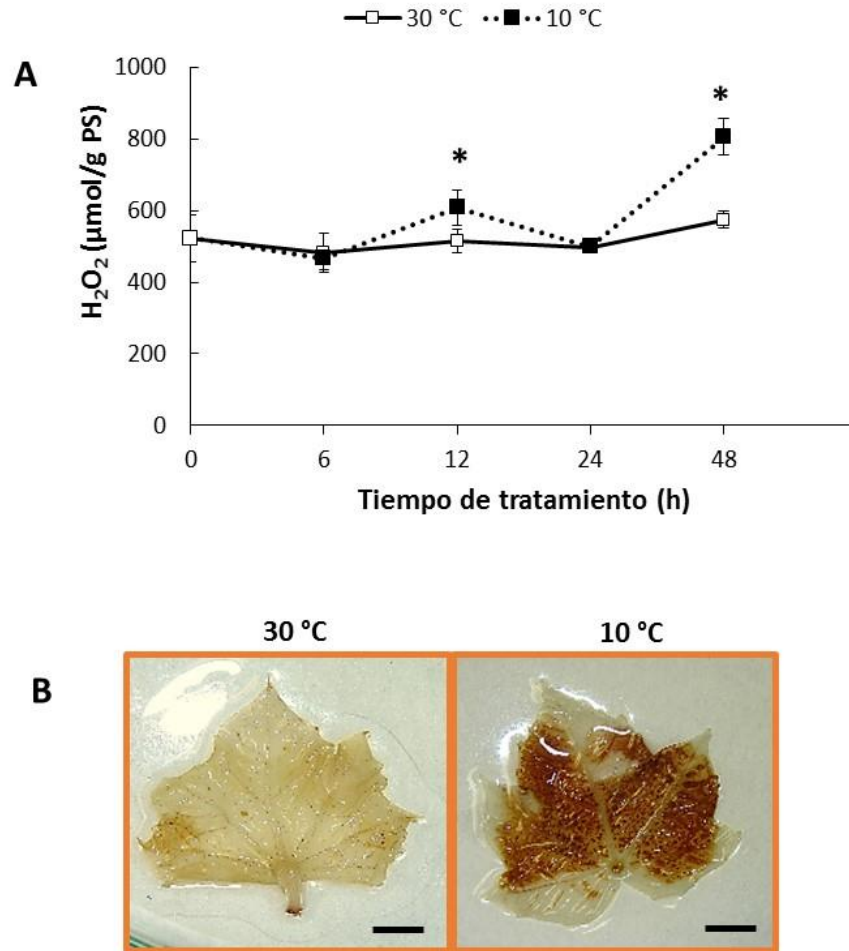


Figura 8. Contenido y detección *in situ* de H₂O₂ en hojas de plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuesta a 10 °C en fotoperiodo (12/12). A. Cambios del contenido de H₂O₂ durante 48 h. B. Detección *in situ* de H₂O₂ en hojas luego de 48 h expuestas a 30 y 10 °C. El H₂O₂ fue detectado por la polimerización del DAB en las hojas. Las plantas mantenidas a 30 °C y fotoperiodo (12/12) fueron consideradas tratamiento control. Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre las plantas expuestas a 30 °C y 10 °C de acuerdo al estimador Tukey.

En las plantas ha sido muy bien estudiado que el estrés por baja temperatura induce una acumulación de ERO's (H_2O_2 , O_2^- , OH^-) (Mittler 2002; Suzuki y Mittler 2006) el cual es significativamente alto en plantas no tolerantes (Prasad et al., 1994; Prasad 1996; Zhu et al., 2013). Las concentraciones altas de H_2O_2 pueden dañar la membrana lipídica e incrementar el contenido de MDA (Apel y Hirt 2004; Krasensky y Jonak 2012). Sin embargo, la regulación de los niveles de H_2O_2 es necesaria para el crecimiento idóneo de la planta. Las plantas han desarrollado un sistema antioxidante enzimático que prevé la acumulación de H_2O_2 y repara el daño oxidativo ocasionado por el estrés abiótico (Mittler 2002).

Diversas investigaciones han reportado que una de las respuestas de las especies y variedades tolerantes a bajas temperaturas es el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes (Guo et al., 2006; Turan y Ekmekçi 2011; Yang et al., 2011). La CAT es la principal enzima que regula los niveles de H_2O_2 en las mitocondrias (Mittler 2002) y el aumento de su actividad ha sido reportado en especies de plantas tolerantes a bajas temperaturas (Guo et al., 2006; Huang y Guo 2005; Wang et al., 2009). Por otra parte, en diferentes compartimentos celulares, la APX juega un papel importante en la regulación de H_2O_2 cuando cataliza la oxidación del AA, y en tanto la GR y el GSH estén involucrados en su regeneración (Noctor y Foyer 1998).

En plantas de *Cucumis sativus* la actividad de la APX y GR aumentó bajo la exposición a bajas temperaturas, sugiriendo que quizá sean las principales enzimas que estarían actuando en la detoxificación del H_2O_2 (Lee y Lee 2000). En nuestro estudio, el incremento de la actividad de las enzimas CAT, APX y GR no fue suficiente para contrarrestar los niveles de H_2O_2 producidos por el efecto del frío al final del tratamiento, lo que implica que quizá la concentraciones de los metabolitos osmoprotectores son limitadas.

La concentración de α -tocoferol en las hojas de las plantas control osciló entre 1.32 y 2.10 $\mu\text{mol/g}$ PS (Figura 9A). En las hojas de las plantas expuestas a 10 °C, la concentración de α -tocoferol a las 12 h aumentó hasta 1.38 veces (de 1.37 $\mu\text{mol/g}$ PS en el control a 1.89 $\mu\text{mol/g}$ PS). El α -tocoferol es un metabolito antioxidante que juega un papel importante bajo condiciones de estrés y su concentración puede verse afectada cuando otros metabolitos participan en los mecanismos de defensa (Munné-Bosch 2005; Havaux et al., 2005). El α -tocoferol, AA y GSH forman una triada antioxidante cuya función es la de proteger a la célula fotosintética contra el estrés abiótico. Por tanto, se ha sugerido que en algunas plantas la regulación del ciclo AA-GSH estarían influyendo en la biosíntesis de α -tocoferol (Foyer y Noctor 2005b).

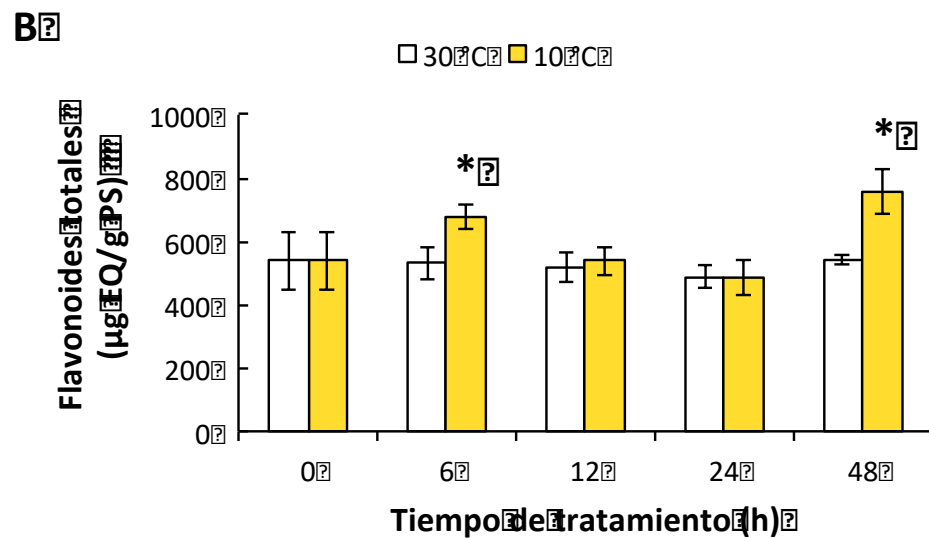
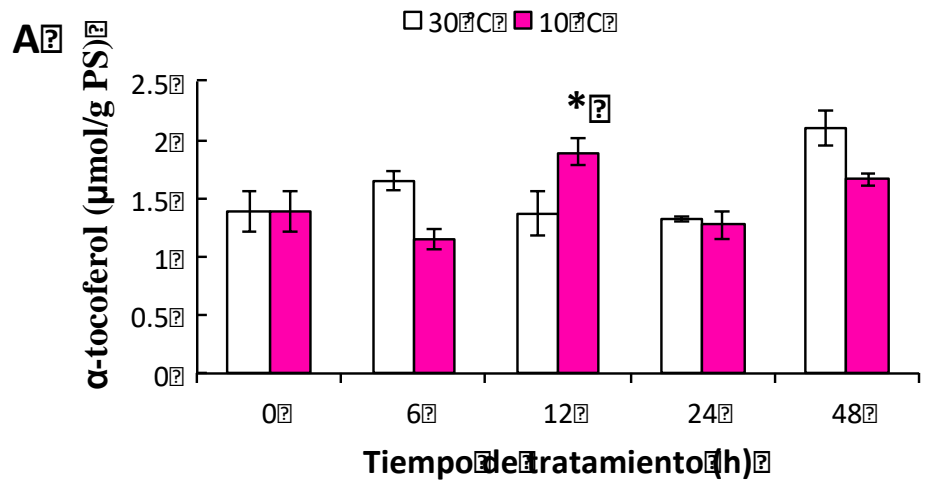


Figura 9. Concentración de: A. α -tocoferol y B. flavonoides totales (B) en hojas de plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C durante 48 h. Las plantas mantenidas a 30 °C fueron consideradas tratamiento control. Los valores representados son la media ($n=3$) \pm DE. El * representa diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las plantas expuestas a 30 °C fotoperiodo de luz y 10 °C en fotoperiodo (12/12) de acuerdo al estimador Tukey.

La concentración de flavonoides totales en las plantas control se mantuvo entre 489 y 540 $\mu\text{g EQ/g PS}$ (Figura 9B). En las plantas expuestas a 10 °C a las 6 h la concentración de flavonoides totales aumentó 1.28 veces (679 $\mu\text{g EQ/g PS}$) y después de 48 h alcanzó 1.4 veces más en comparación a las plantas control (de $540.72 \pm 13.05 \mu\text{g EQ/g PS}$ a $756 \pm 68.53 \mu\text{g EQ/g PS}$). El incremento de la concentración de flavonoides en 6 y 48 h después del tratamiento al frío quizá esté compensando la baja concentración de otros metabolitos antioxidantes como el α -tocoferol (Figura 9A). Una de las principales funciones de los flavonoides es el actuar como antioxidantes para la prevención del daño fotooxidativo y fototoinhibición ocasionados por el estrés por frío (Havaux y Klopstech 2001).

En este estudio la pequeña acumulación de flavonoides después del tratamiento con frío no fue suficiente para contrarrestar la peroxidación lipídica, la cual fue evaluada por los niveles de MDA (Figura 7B). Korn et al. (2008) reportan que la aclimatación o tolerancia al frío está influenciada por la concentración y perfil de flavonoides producidos por la planta y su participación podría proteger los lípidos insaturados a través de la inactivación de la lipooxigenasa evitando la formación de radicales peroxilo y MDA (Samanta et al., 2011).

Con el objetivo de conocer el perfil de los flavonoides, se realizó un análisis de HPTLC de los extractos de las hojas de las plantas control y expuestas a 10 °C por 48 h (Figura 10). Las bandas correspondientes a vitexina e isovitexina son más intensas en las hojas de las plantas expuestas a 10 °C comparado a las hojas control (Figura 10A), lo cual está representado gráficamente en la Figura 10B. La isovitexina y vitexina son formadas a partir de la apigenina; la vitexina y sus derivados (acetilvitexina y 2''-O-ramnósido de vitexina) han sido reportados por ser estimulados por el efecto del frío en plantas de *C. laevigata* y *C. monogyna* (Kirakosyan et al., 2003; Kirakosyan et al., 2004).

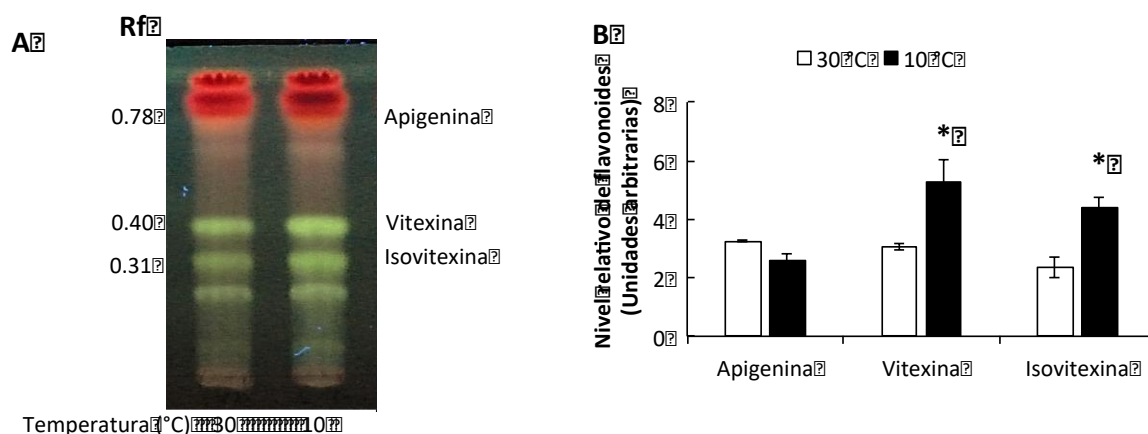


Figura 10. Perfil de flavonoides en plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C por 48 h. A. HPTLC y B. Nivel relativo de flavonoides en hojas. El HPTLC fue desarrollado en la fase móvil: tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: agua (16:8:2:1); revelado con PEG-3350 y DPBA y observado a 366 nm. Los valores de apigenina, vitexina e isovitexina representados son los determinados mediante la densidad relativa de las bandas del compuesto con respecto al fondo utilizando el programa JustTLC versión 4.0.3. Los valores representados son la media (n= 2) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre los flavonoides de las plantas expuestas a 30 °C y 10 °C de acuerdo al estimador Tukey.

Para investigar la participación del ABA en la activación de los flavonoides y los niveles de H₂O₂ inducidos por frío, se realizó un estudio *in situ* con hojas de plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas.

La Figura 11 representa los niveles de H₂O₂ y flavonoides en las hojas bajo el tratamiento de frío (-ABA 10 °C) y ABA 100 μM (+ABA 30 °C). Las hojas bajo tratamiento con frío acumularon H₂O₂ en un 60% más que el control (-ABA 30 °C), mientras que la adición de ABA a las hojas sometidas a tratamiento con frío (+ABA 10 °C) generó una acumulación de 8.4% de H₂O₂ (Figura 11C), en ambos tratamientos el H₂O₂ se acumuló en el mesófilo

de la hoja (Figura 11A). Las hojas control y las tratadas con ABA presentaron una acumulación de H_2O_2 de 1.3 y 2.6%, respectivamente (Figura 11A y C).

Para detectar la presencia de flavonoides en cada tratamiento, se evaluó la fluorescencia emitida por el DPBA, el cual interactúa con los flavonoides presentes en el tejido. En cada tratamiento, las hojas emitieron una fluorescencia de color amarillo-verdosa (Figura 11B). El porcentaje de fluorescencia de los flavonoides es diferencialmente acumulado en los tratamientos (Figura 11D). Los tratamientos a 10 °C (-ABA 10 °C y +ABA 10 °C) registraron el mayor porcentaje en la intensidad de fluorescencia después de 48 h de tratamiento. Estos resultados sugieren, que el ABA participa en la acumulación de los flavonoides (Figura 11B) en las hojas expuestas a baja temperatura, los cuales reducen los niveles de H_2O_2 producido por el frío.

Se ha reportado que la ruta de señalización del ABA está involucrada en el cierre estomático como respuesta a estrés ambiental (Cho et al., 2009) y esta ruta es modulada por el H_2O_2 que actúa como segundo mensajero (Zhang et al., 2001; Neill et al., 2002) de esta manera se estaría previniendo el daño oxidativo (Mittler 2002; Apel y Hirt, 2004). En hojas de plántulas de arroz tratadas con ABA (40 μ M) el incremento de la concentración de H_2O_2 estuvo asociado con la acumulación de antocianinas (Hung et al., 2008). Además se ha propuesto que los flavonoides del mesófilo inducidos por estrés por luz en hojas de *Ligustrum vulgare* pueden reducir los niveles de H_2O_2 producido a nivel de cloroplastos, cuando los metabolitos osmoreguladores o antioxidantes se ven afectados (Agati et al., 2009).

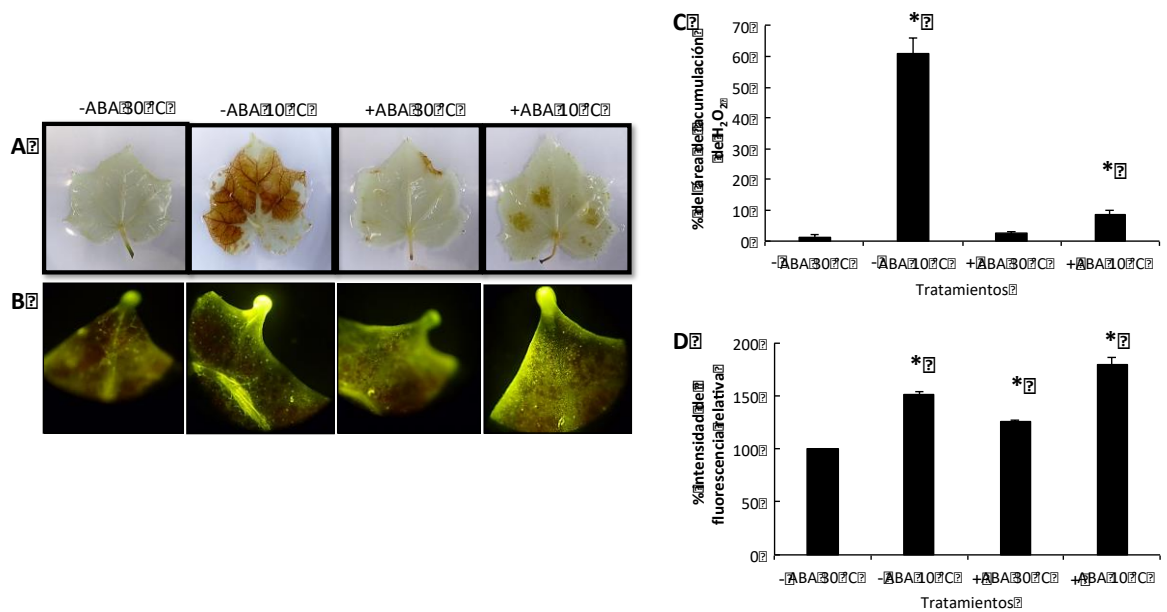


Figura 11. Detección *in situ* de H₂O₂ y flavonoides en hojas de plantas de *J. curcas*, variedad I-Chiapas expuestas a 10 °C y tratadas con 100 μM de ABA (-, sin ABA; +, con ABA). A. H₂O₂ *in situ*. B. Fluorescencia de flavonoides. C. Porcentaje del área de acumulación de H₂O₂ y D. Porcentaje de intensidad de fluorescencia de flavonoides. El tratamiento correspondiente a 30 °C fue considerado tratamiento control. El DAB fue utilizado para la detección de H₂O₂ y el DPBA para la tinción de flavonoides. Los valores de % de área de acumulación de H₂O₂ e intensidad de fluorescencia fueron obtenidos mediante el uso del software Image J. Los valores representados son la media (n= 2) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre los tratamientos de acuerdo al estimador Tukey.

6.3 Efecto de la aplicación exógena del AJ en el perfil de flavonoides, contenido de antocianinas y respuesta antioxidante en dos variedades (I-64 e I-52) de plantas de *J. curcas*.

En el artículo “Antioxidant responses under jasmonic acid elicitation comprise enhanced production of flavonoids and anthocyanins in *Jatropha curcas* leaves” (Anexo 2) se presentan los resultados experimentales y discusión de ellos en relación al efecto del AJ sobre el perfil de flavonoides, acumulación de antocianinas, concentración de peróxido de hidrógeno y respuesta antioxidante en hojas de plantas de *J. curcas*, variedades I-64 e I-52.

6.4 Efecto de la aplicación exógena del AJ en los marcadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante en plantas de *J. curcas*, variedad I-52 expuestas a una baja temperatura (5 °C).

Para analizar el efecto de baja temperatura (5°C) en plantas de 75 d de *J. curcas*, variedad I-52, se monitorearon durante 48 h los síntomas de daño (Figura 12A) y el contenido de MDA (Figura 12B) en las hojas.

La Figura 12A muestra síntomas característicos (flacidez y marchitez) por el efecto del frío, los cuales iniciaron después de 12 h. En otras variedades de *J. curcas*, Gao et al. (2013) encontraron alteraciones morfológicas en el área foliar 3 h después de su exposición a 4°C. En las plantas tropicales y subtropicales los cambios en su temperatura óptima de crecimiento puede alterar su estatus metabólico y fisiológico, los cuales se manifiestan en reducción de la expansión foliar, marchitamiento, clorosis e incluso necrosis (Mahajan y Tuteja, 2005).

La peroxidación lipídica es un evento que se manifiesta por el efecto de bajas temperaturas en el cambio en la permeabilidad de la membrana, cuyo resultado es la producción de

MDA (Campos et al., 2003). Las plantas expuestas a 5°C mostraron una mayor acumulación de MDA alcanzando 2.4 veces su concentración después de 48 h en comparación al control (Figura 12B). Resultados similares han sido reportados en *J. curcas*, donde la exposición a bajas temperaturas (4°C) desencadena un incremento en las concentraciones de MDA (Zheng et al., 2009; Gao et al., 2013). Es importante mencionar que las plantas que presentan una pobre adaptación a bajas temperaturas son mayormente afectadas en sus procesos fisiológicos y metabólicos, lo que conlleva a un alto grado de oxidación en la membrana, resultando en niveles elevados de MDA (Zheng et al., 2009).

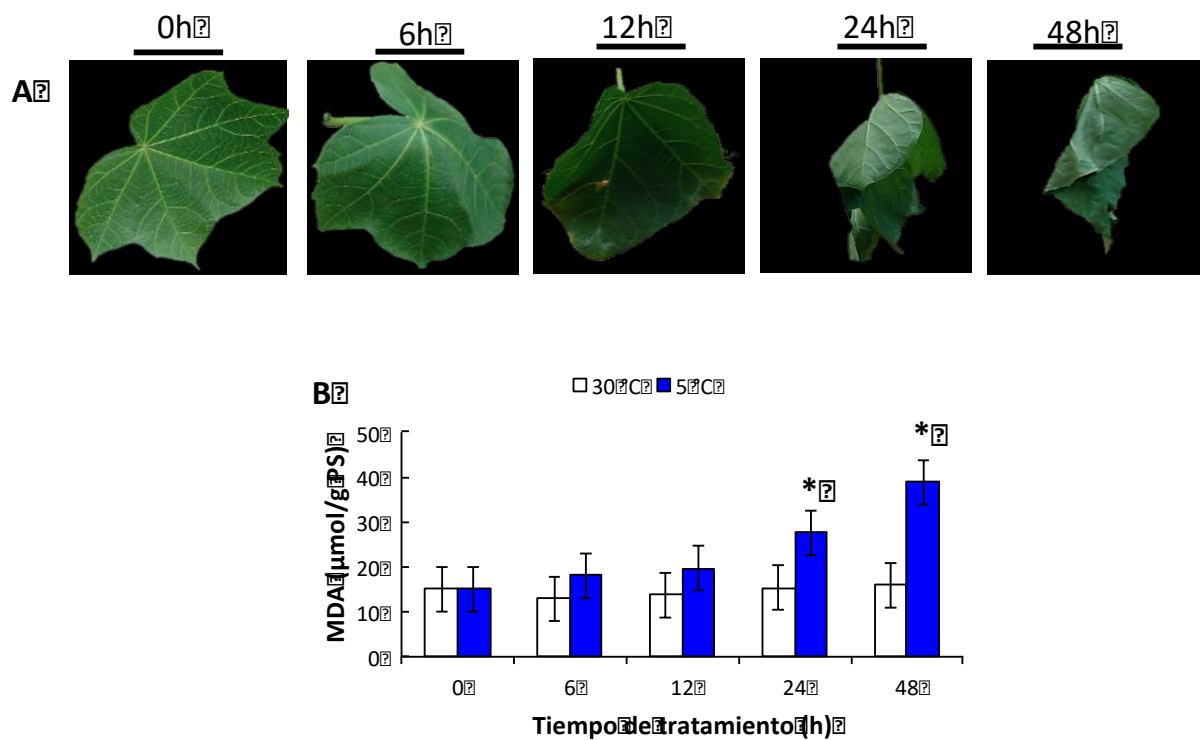


Figura 12. Plantas de *J. curcas* variedad I-52 expuestas a 5 °C por 48 h en oscuridad A. Síntoma de daño en la hoja y B. Contenido de MDA. Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre las barras de acuerdo al estimador Tukey.

En plantas de *Digitaria eriatha* tolerantes a bajas temperaturas, la acumulación de AJ endógeno estuvo asociada a bajos niveles de MDA, lo que sugiere que el AJ estaría involucrado en la regulación de las ERO's (Garbero et al., 2011). Con el objetivo de encontrar una concentración óptima de AJ y niveles bajos de MDA, las plantas de *J. curcas* variedad I-52 fueron pretratadas con cinco concentraciones de AJ, 0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM y 4.0 mM y posteriormente expuestas al frío (5°C).

Las plantas de *J. curcas*, variedad I-52 pretratadas con AJ en 0.25 mM y 1.0 mM y posteriormente sometidas a 5°C mostraron concentraciones bajas de MDA (28.43 ± 2.49 $\mu\text{mol/g PS}$ para AJ 0.25 mM y 26.14 ± 2.26 $\mu\text{mol/g PS}$ en AJ 1.0 mM) comparada a los niveles de MDA en el tratamiento por 5 °C (36.26 ± 0.83 $\mu\text{mol/g PS}$; Figura 13). Estos resultados sugieren que la baja acumulación de MDA (disminución de 28% con respecto al tratamiento con frío) y recuperación foliar de las plantas en el tratamiento con AJ 1 mM podría estar asociada a un mecanismo de defensa adaptativo al estrés por frío. En consecuencia, la concentración de AJ 1.0 mM fue seleccionada para pre-tratar las plantas para los siguientes experimentos.

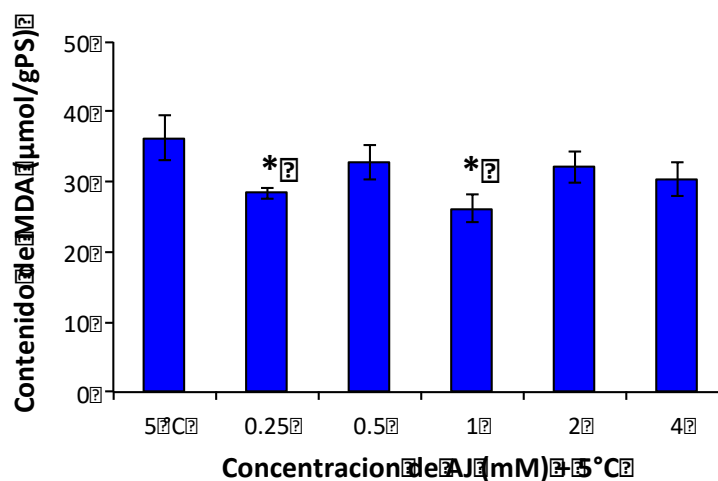


Figura 13. Contenido de MDA en plantas pretratadas con diferentes concentraciones de AJ en *J. curcas*, variedad I-52 expuestas a 5 °C por 48 h en oscuridad. El tratamiento a 5 °C fue considerado como control. Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre las barras de acuerdo al estimador Tukey.

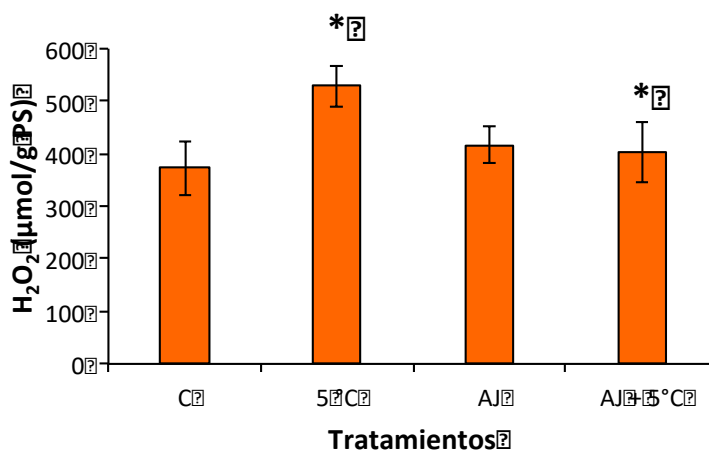


Figura 14. Concentración de H₂O₂ después de 48 h de tratamiento con AJ 1 mM y frío (5 °C) en plantas de *J. curcas*, variedad I-52. Las plantas mantenidas a 30 °C fueron consideradas como tratamiento control. Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre los tratamientos de acuerdo al estimador Tukey.

Varios estudios han demostrado que el estrés provocado por las bajas temperaturas induce una sobreproducción de H₂O₂ principalmente en plantas no tolerantes al frío (Prasad et al., 1994; Prasad 1996; Zhu et al., 2013). En la Figura 14 se muestra que los niveles de H₂O₂ en las plantas control y pre-tratadas con AJ (tratamiento AJ y AJ + 5 °C) fueron similares, pero en las plantas expuestas a frío (5 °C) el H₂O₂ se incrementó en un 40%. Estos resultados sugieren que el AJ podría activar el sistema antioxidante para la regulación de los niveles de H₂O₂ cuando las plantas son expuestas a baja temperatura (5 °C). Los mecanismos de defensa inducidos por baja temperatura son controlados por una red de rutas de transducción de señales interconectadas, donde el AJ podría activar la transcripción coordinada de varios genes relacionados con la defensa de la planta (Glazebrook 2005). Además, en plantas de *Arabidopsis* sometidas a frío, se ha reportado que los jasmonatos regulan el factor ICE-CBF/DREB1, el cual está involucrado en la respuesta de tolerancia al estrés provocado por frío (Hu et al., 2013).

Las enzimas junto con los metabolitos antioxidantes proveen a la célula de un sistema eficiente en la detoxificación de los niveles de ERO's, pero en condiciones de estrés puede ocurrir un desequilibrio en su función (Gill y Tuteja 2010). Para tener una idea del efecto del frío sobre el sistema antioxidante en las plantas de *J. curcas*, variedad I-52, se evaluó la actividad de la CAT y APX, así como metabolitos antioxidantes (α -tocoferol, flavonoides y antocianinas) después de 48 h de tratamiento.

La actividad de la CAT en plantas expuestas a frío (5 °C) incrementó en 3.2 veces y la actividad de la APX disminuyó en un 61% comparado al control (Tabla 10). Sin embargo, cuando las plantas fueron sujetas al tratamiento AJ + 5 °C se observó un incremento de 2 veces la actividad de la CAT y APX cuando es comparada con las plantas sometidas a frío (Tabla 10). Se ha reportado que cuando las plantas son tratadas con AJ o MJ la proteína, la actividad o la expresión de la CAT (Kumari et al., 2006) y APX (Sasaki-Sekimoto et al.,

2005; Wolucka et al., 2005) aumenta. La CAT se encuentra comúnmente localizada en los peroxisomas y a diferencia de la APX es una enzima que no requiere de un sustrato reducido para actuar y secuestrar eficientemente el H₂O₂ generado (Mittler et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado en plantas de *Arabidopsis* que el MJ tiene un efecto en la actividad de la APX1 citosólica, la cual podría estar implicada, en la regulación de los niveles de H₂O₂ bajo condiciones de estrés oxidativo (Maruta et al., 2012).

Tabla 10. Actividad enzimática de CAT y APX después de 48 h de tratamiento con AJ y 5 °C en plantas de *J. curcas*, variedad I-52.

Tratamiento	Actividad de enzimas antioxidantes (U/mg proteína)	
	CAT	APX
C	0.58 ± 0.06	14.54 ± 0.63
5 °C	1.86 ± 0.08*	5.64 ± 0.08*
AJ	0.36 ± 0.05*	16.24 ± 0.76*
AJ + 5 °C	3.09 ± 0.08*	10.53 ± 0.23*

Los tratamientos son representados por el control (C), frío (5 °C), 1 mM de ácido jasmónico (AJ) y 1 mM de ácido jasmónico + frío (AJ + 5 °C). CAT: catalasa y APX: ascorbato peroxidasa. El * representa diferencia significativa (P < 0.05) entre los tratamientos de acuerdo al estimador Tukey.

Las plantas de *J. curcas* sometidas al frío (5 °C) después de 48 horas, mostraron una disminución de 70% en la concentración de α -tocoferol (Tabla 11). Sin embargo, la aplicación de AJ a las plantas sometidas a frío (AJ + 5 °C) incrementó la concentración de α -tocoferol hasta 3.5 veces acompañado de una baja acumulación en la peroxidación lipídica en comparación a las plantas expuestas a 5 °C (Figura 13). En condiciones de estrés (osmótico), mutantes *vtc-1* de *Arabidopsis* aumentaron la concentración de α -tocoferol para evitar la acumulación de MDA (Munné-Bosch y Alegre 2002). En las

membranas de las células vegetales se localiza el α -tocoferol cuya función principal es el secuestro del singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), eliminación de otros radicales, particularmente los radicales peroxilo y terminar las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica en el sistema celular (Munné-Bosch 2005).

Tabla 11. Concentración de α -tocoferol, flavonoides totales y antocianinas después de 48 h de tratamiento con AJ y 5 °C en plantas de *J. curcas*, variedad I-52.

Tratamiento	α -tocoferol ($\mu\text{mol/g PS}$)	Flavonoides totales ($\mu\text{g EQ/g PS}$)	Antocianinas ($\mu\text{g/g PS}$)
C	5.00 \pm 0.10	292.22 \pm 21.91	1.50 \pm 0.14
5 °C	1.50 \pm 0.14*	201.65 \pm 7.04*	14.87 \pm 1.10*
AJ	5.90 \pm 0.52*	343.59 \pm 78.46*	1.65 \pm 0.18*
AJ + 5 °C	5.20 \pm 0.17*	357.45 \pm 21.37*	4.80 \pm 0.36*

Los tratamientos son representados por el control (C), frío (5 °C), 1 mM de ácido jasmónico (AJ) y 1 mM de ácido jasmónico +frío (AJ + 5 °C). CAT: catalasa y APX: ascorbato peroxidasa. El * representa diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos de acuerdo al estimador Tukey.

En diversas plantas bajo condiciones ambientales adversas, los flavonoides y las antocianinas son biosintetizados a partir de la ruta de fenilpropanoides, los cuales son inducidos o regulados en respuesta al estrés oxidativo (Fini et al., 2011; Zhu et al., 2013). La Tabla 11 muestra una acumulación diferencial de flavonoides y antocianinas después de 48 h de evaluación entre los tratamientos 5 °C y AJ + 5 °C. En las células los genes involucrados en la conexión de la biosíntesis de flavonoides y antocianinas requieren de una regulación coordinada para la activación de las enzimas que participan en la ruta metabólica requerida (Dixon et al., 2005; Pelletier y Shirley 1996). En *Arabidopsis* la

flavonol hidrolasa (F3'H), enzima que participa en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas estaría doblemente regulada para la producción de estos metabolitos secundarios por el complejo transcripcional TTG1 (Gonzalez et al., 2008).

La acumulación de flavonoides y antocianinas ha sido asociada en la prevención de la peroxidación lipídica. En particular, los flavonoides pueden interactuar con las membranas de las células durante la deshidratación celular ocasionada por el frío para evitar el daño oxidativo, lo cual depende de la capacidad hidrofílica y grupos hidroxilo de su molécula (Erlejman et al., 2004; Moellering et al., 2010). Además, se ha demostrado que las antocianinas pueden secuestrar el O_2^- mediante una reacción de blanqueamiento a través del sistema xantina-xantina oxidasa (Yamasaki et al., 1996). Esto parece indicar que la acumulación de antocianinas durante el estrés por frío es un mecanismo alternativo que utiliza la planta en el secuestro de O_2^- en ausencia de luz (Zhu et al., 2013). Este mecanismo podría estar ocurriendo en las plantas de *J. curcas* en respuesta a la acumulación de H_2O_2 generado por el efecto del frío en condiciones de oscuridad.

6.5 Efecto de la sacarosa y AJ en el contenido de antocianinas, marcadores de estrés y respuesta antioxidante en plantas de *J. curcas*, variedad I-52 y I-64.

Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés osmótico inducido por la aplicación de sacarosa en dos variedades (I-52 e I-64) de *J. curcas*, se evaluaron los niveles de antocianinas después de 5 d de tratamiento. Las variedades I-52 e I-64 incrementaron la concentración de antocianinas hasta 1.6 (2.05 ± 0.32 a 3.17 ± 0.66 $\mu\text{g/g PS}$) y 1.4 (1.90 ± 0.30 a 2.59 ± 0.15 $\mu\text{g/g PS}$) veces respectivamente con respecto al control, después de ser tratadas 5 d con sacarosa 300 mM (Figura 15). Sin embargo, el efecto estimulador de la sacarosa 300 mM fue más pronunciado en la variedad I-52 que en la variedad I-64. La variedad I-52 resultó tener una mayor susceptibilidad al efecto de la sacarosa e inducir la biosíntesis de antocianinas que la variedad I-64, después de 5 d de tratamiento. Por este hecho, se aplicó la concentración de 300 mM de sacarosa en la variedad I-52 para monitorear la respuesta oxidante y antioxidante en el siguiente experimento.

Los cambios de los niveles de H_2O_2 y MDA bajo el efecto del estrés osmótico inducido por la sacarosa son representados en la figura 16. Las plantas tratadas con sacarosa incrementaron altos niveles de H_2O_2 (3.5 veces) y MDA (1.96 veces) comparado al control. El tratamiento individual con AJ y combinado con sacarosa mostraron un ligero incremento en la concentración de H_2O_2 (Figura 16A), pero la peroxidación lipídica permaneció sin cambios notables (Figura 16B).

Las plantas expuestas a estrés osmótico sufren alteraciones metabólicas y fisiológicas en las células y en consecuencia elevados niveles de H_2O_2 son producidos en los cloroplastos y peroxisomas. El H_2O_2 producido podría actuar como segundo mensajero para regular la señalización de las hormonas durante el desarrollo y en respuesta al estrés ambiental (Neill et al., 2002). De esta manera, el H_2O_2 podría estar mediando la señalización del AJ para la

activación de las respuestas de defensa y evitar alteraciones metabólicas en las células (Orozco-Cárdenas et al., 2001; Sasaki-Sekimoto et al., 2005).

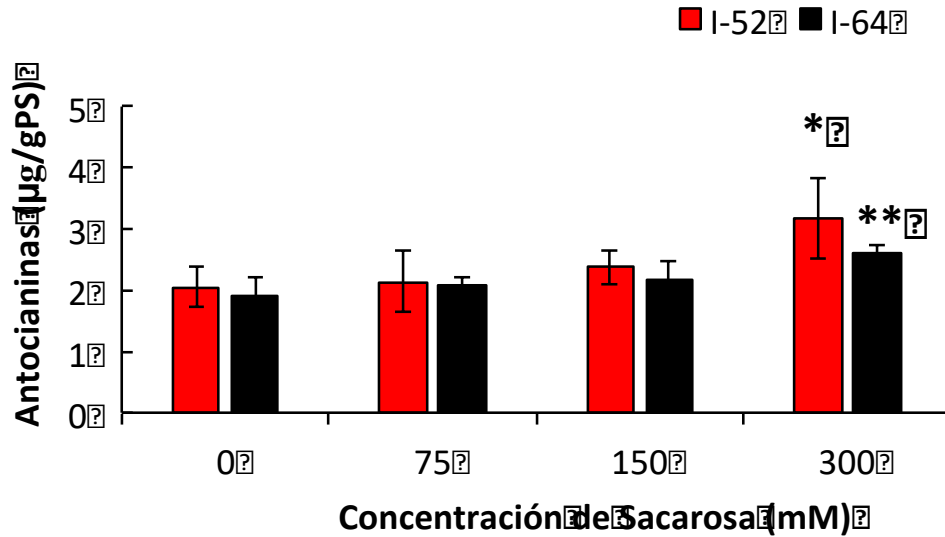


Figura 15. Contenido de antocianinas en plantas de *J. curcas*, variedad I-52 e I-64 después de 5 d de tratamiento con diferentes concentraciones de sacarosa. Plantas control (0 mM de sacarosa). Los valores representados son la media ($n= 3$) \pm DE. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos son representados por * para la variedad I-52 y ** variedad I-64 de acuerdo al estimador Tukey.

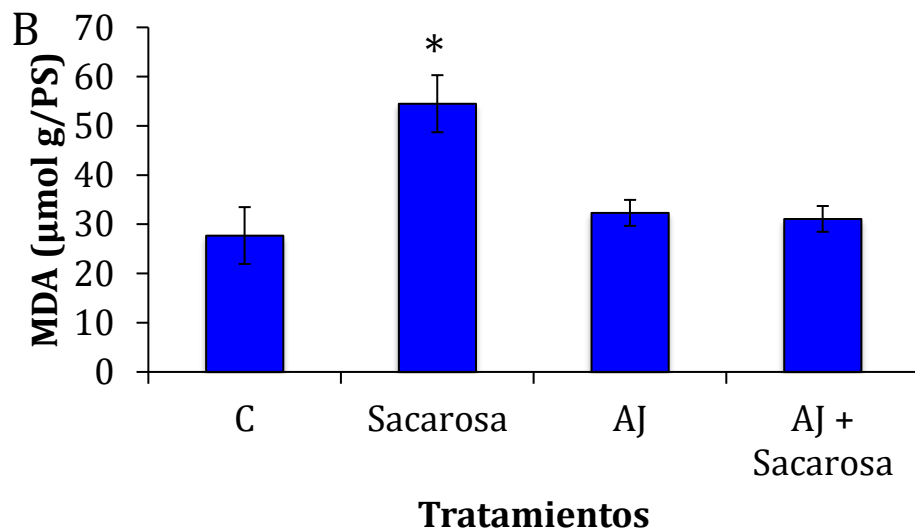
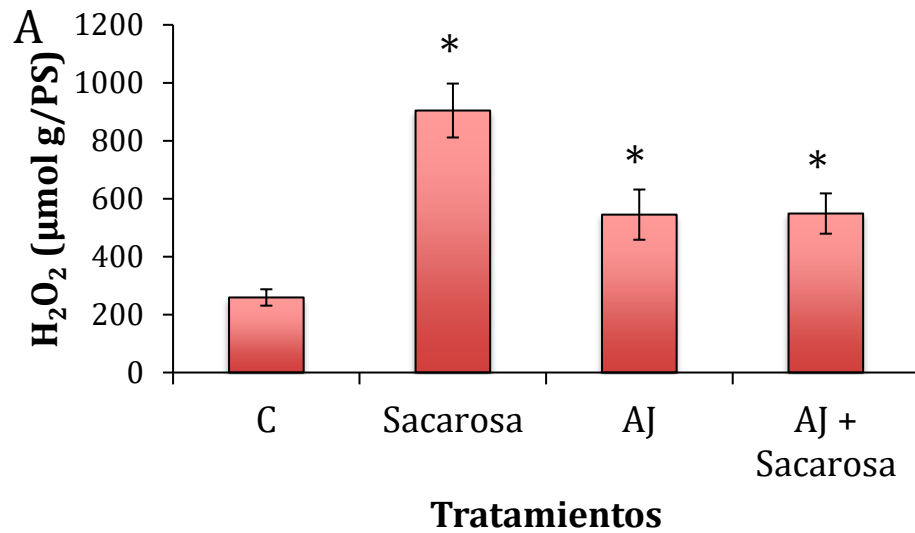


Figura 16. Concentración de: A. H₂O₂ y B. MDA después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de *J. curcas*, variedad I-52. Los tratamientos son representados por el control (C), 300 mM de sacarosa, 1 mM de ácido jasmónico (AJ) y 1 mM de ácido jasmónico + 300 mM de sacarosa (AJ + sacarosa). Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

Comparado a las plantas control, la enzima APX fue inhibida en un 44% en los tratamientos con sacarosa y bajo el efecto con AJ su actividad fue ligeramente disminuida

en un 21%. En estos tratamientos la CAT mostró un ligero incremento en su actividad después de 5d de evaluación. Por otro lado, un incremento en la actividad enzimática de ambas enzimas (APX hasta 3.5 veces y CAT 2.3 veces comparado con el tratamiento de sacarosa) fue observado en las plantas tratadas con AJ + sacarosa (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad enzimática de CAT y APX después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de *J. curcas*, variedad I-52.

Tratamiento	Actividad de enzimas antioxidantes (U/mg proteína)	
	CAT	APX
C	0.12 ± 0.01	6.19 ± 1.50
sacarosa	0.17 ± 0.04*	3.47 ± 1.90*
AJ	0.18 ± 0.03*	4.88 ± 0.80*
AJ + sacarosa	0.42 ± 0.05*	17.21 ± 1.30*

Los tratamientos son representados por el control (C), 300 mM de sacarosa (Sacarosa), 1 mM de ácido jasmónico (AJ) y 1 mM de ácido jasmónico + 300 mM de sacarosa (AJ + Sacarosa). CAT: catalasa y APX: ascorbato peroxidasa. Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

El pequeño aumento de la actividad de la CAT no fue suficiente para compensar la baja de la actividad de la APX y neutralizar los niveles elevados de H₂O₂ en las plantas expuestas a sacarosa 300 mM. Las enzimas APX y CAT son consideradas las principales reguladoras de los niveles de H₂O₂ en las células (Foyer y Noctor 2005a). Sgherri y Navari-Izzo (1995), reportan una disminución en la concentración de ascorbato en plantas de girasol expuestas a estrés por sequía, el cual fue acompañado por una inhibición en la actividad de la APX.

En las plantas de *J. curcas* expuestas a sacarosa los niveles de AA podrían estar limitados, lo cual estaría repercutiendo en la actividad de la APX para una eficiente regulación de H₂O₂. En contraste, la aplicación de AJ a las plantas de *J. curcas* sometidas a un

tratamiento con sacarosa incrementó la actividad de la CAT y APX, las cuales estarían ayudando a reducir la peroxidación (Figura 16B). De manera similar en plantas de *Glycine max* tratadas con jasmonatos (MJ) y sometidas a un estrés por sequía durante 15 días, la actividad de las enzimas antioxidantes fueron incrementadas durante la evaluación del tratamiento (Anjum et al., 2011). En diversos estudios se ha mostrado que en varias especies de plantas expuestas a estrés osmótico incrementan los niveles de AJ endógeno (Wasternack y Hause 2002; Pedranzani et al., 2003 y 2007; Wasternack 2007). Además, se ha demostrado que la señalización de los jasmonatos activa el sistema antioxidante, incluyendo el metabolismo del ascorbato (Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Wolucka et al., 2005).

Los niveles de α -tocoferol en las plantas expuestas a sacarosa se mantuvieron semejantes al control. Sin embargo, la biosíntesis del α -tocoferol fue inducida por la aplicación de AJ en las plantas. La concentración de α -tocoferol se incrementó 1.6 veces en el tratamiento AJ + sacarosa con respecto a las plantas expuestas a sacarosa 300 mM (Tabla 13).

Ha sido reportado que la biosíntesis de α -tocoferol es regulada por los jasmonatos a nivel de la tirosina aminotransferasa y *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa para su acumulación (Sandorf y Holländer-Czytko 2002) y así prevenir eficientemente la oxidación de los lípidos durante el proceso de deshidratación celular provocado por el estrés osmótico (Munné-Bosch y Alegre 2002).

Tabla 13. Concentración de α -tocoferol, flavonoides totales y antocianinas después de 5 d de tratamiento con AJ y sacarosa en plantas de *J. curcas*, variedad I-52.

Tratamiento	Metabolitos antioxidantes		
	α -tocoferol ($\mu\text{mol/g PS}$)	Flavonoides totales ($\mu\text{g EQ/g PS}$)	Antocianinas ($\mu\text{g/g PS}$)
C	5.68 ± 0.76	223.19 ± 15.88	2.05 ± 0.32
sacarosa	5.56 ± 0.38	$366.21 \pm 9.76^*$	$3.17 \pm 0.66^*$
AJ	$10.05 \pm 0.50^*$	$265.13 \pm 12.67^*$	$5.56 \pm 0.34^*$
AJ + sacarosa	$8.89 \pm 0.52^*$	$250.87 \pm 16.77^*$	$22.07 \pm 0.48^*$

Los tratamientos son representados por el control (C), 300 mM de sacarosa (Sacarosa), 1 mM de ácido jasmónico (AJ) y 1 mM de ácido jasmónico + 300 mM de sacarosa (AJ + Sacarosa). Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

La tabla 13 muestra que las plantas expuestas a tratamiento individual con sacarosa y AJ inducen un ligero incremento en la acumulación de flavonoides y antocianinas. Sin embargo, cuando se aplicó AJ a las plantas tratadas con sacarosa 300 mM la concentración de antocianinas se incrementó hasta 7 veces (de $3.17 \pm 0.66 \mu\text{g/g PS}$ a $22.07 \pm 0.48 \mu\text{g/g PS}$) pero la acumulación de flavonoides disminuyó en un 31% comparado con el tratamiento individual de sacarosa. Los flavonoides participan en la protección de la membrana celular evitando el daño oxidativo generado por el estrés (Gould et al., 2002; Hendrich 2006). En varias especies de plantas tratadas con AJ (Devoto y Turner 2003; Shan et al., 2009) y estrés osmótico se ha reportado una acumulación de compuestos polifenólicos (Winkel-Shirley 2001; Solfanelli et al., 2006; Tattini et al., 2006).

La aplicación de AJ y sacarosa sobre las plantas de *J. curcas* incrementó la concentración de antocianinas, lo cual fue aceptable con las observaciones reportadas para hojas de plantas de maíz (Kim et al., 2006). Loreti et al., (2008) sugieren que AJ al interactuar con la sacarosa induce un efecto sinérgico, resultando en la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas. La acumulación de antocianinas en las plantas de *J. curcas* bajo el efecto de AJ y sacarosa, posiblemente estén teniendo una

función en el equilibrio osmótico para mantener el funcionamiento de la célula y para compensar el daño inducido por la sacarosa.

En otro experimento con el objetivo de analizar los niveles de antocianinas en hojas con diferentes grados de coloración se evaluaron plantas de la variedad I-52 de 1 año 60 d (Figura 17). La concentración de antocianinas estuvo asociada a la coloración de las hojas. El orden de los niveles de antocianinas en los extractos de las hojas fueron hoja roja > hoja verde/roja > hoja verde (Figura 17). Por lo tanto, los extractos de las hojas rojas fueron utilizados para la identificación de antocianinas con el uso de placas de HPTLC, como análisis exploratorio. Posteriormente el HPLC fue utilizado para la identificación de las antocianidinas en los extractos.

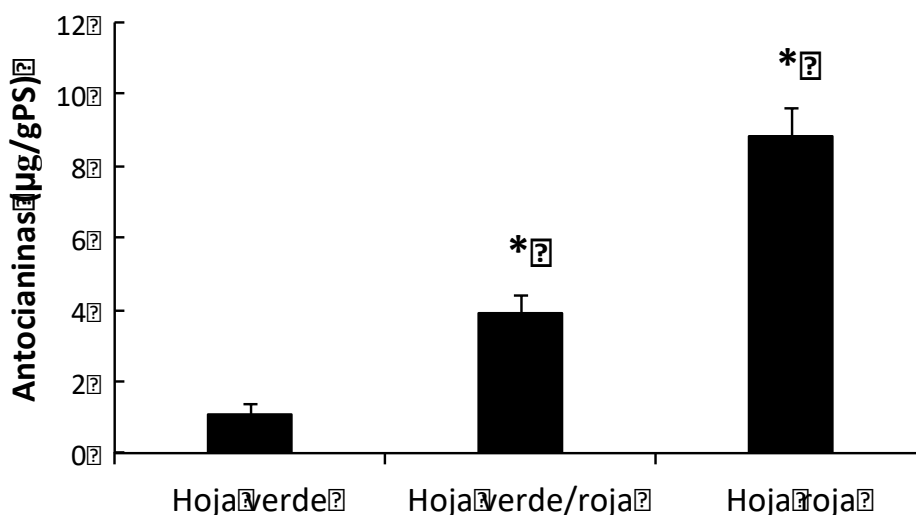


Figura 17. Niveles de antocianinas en diferentes grados de pigmentación en las hojas de *J. curcas*, variedad I-52. Los valores promedio con * son significativamente diferentes de con respecto a los extractos de las hojas verdes tomando una $P < 0.05$.

El análisis de HPTLC reveló dos bandas de color púrpura (Figura 18A), las cuales corresponden a los R_f reportados para delphinidina 3-glicosilada (R_f 0.28) y cianidina 3-

glicosilada (R_f 0.38) (Harborne 1967). En base a este resultado, se planteó identificar las antocianidinas del extracto metanólico acidificado (purificado e hidrolizado) de *J. curcas*, variedad I-52. Debido a la falta de estándares comerciales, se utilizó el extracto de uva como punto de referencia, en el cual se han identificado cinco antocianidinas (Durst y Wrolstad 2001). Los resultados del análisis de HPLC de los extractos de uva y *J. curcas* se resumen en la Tabla 14 y los cromatogramas de HPLC se muestran en la Figura 18B-D.

Tabla 14. Resultado del análisis de HPLC de extractos de uva y hojas de *J. curcas*, variedad I-52.

# pico	Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Área bajo la curva (μ Au)		
			Extracto concentrado de uva	Extracto de <i>J. curcas</i>	Co-elución de extracto de uva y <i>J. curcas</i>
1	10.96	Delfinidina	83613.3	7526.2	80528.7
2	14.72	Cianidina	54193.5	17602.0	65343.1
3	16.16	Petunidina	66279.5	-	53624.4
4	20.77	Peonidina	25065.6	-	19099.2
5	21.87	Malvidina	42110.3	-	27802.2

En los extractos de uva, el cromatograma de HPLC muestra la presencia de cinco picos (Figura 18 B), donde su identificación fue posible por la comparación del perfil y espectros de UV reportados por Durst y Wrolstad (2001). Las antocianinas fueron identificadas como delfinidina (pico **1**), cianidina (pico **2**), petunidina (pico **3**), peonidina (pico **4**) y malvidina (pico **5**). Por otro lado, el extracto de *J. curcas* muestra dos picos (Figura 18C) que absorben a 520 nm (Figura 18C insertada), espectro de UV característico de las antocianinas (Dugo *et al.*, 2003, 2004). Con el objetivo de corroborar la identificación del pico 1 y 2 del extracto de *J. curcas*, se llevó a cabo el método de co-elución del extracto de

uva y de *J. curcas* (Figura 18D). Los picos eluidos en un tiempo de retención de 10.96 min (pico **1**, 512.1 nm) y 14.72 min (pico **2**, 503.3 nm) coincidieron con el pico 1 (delfinidina) y pico 2 (cianidina) del extracto de uva. Cabe destacar que por primera vez se reportan las antocianidinas en extractos purificados e hidrolizados de hojas de *J. curcas*.

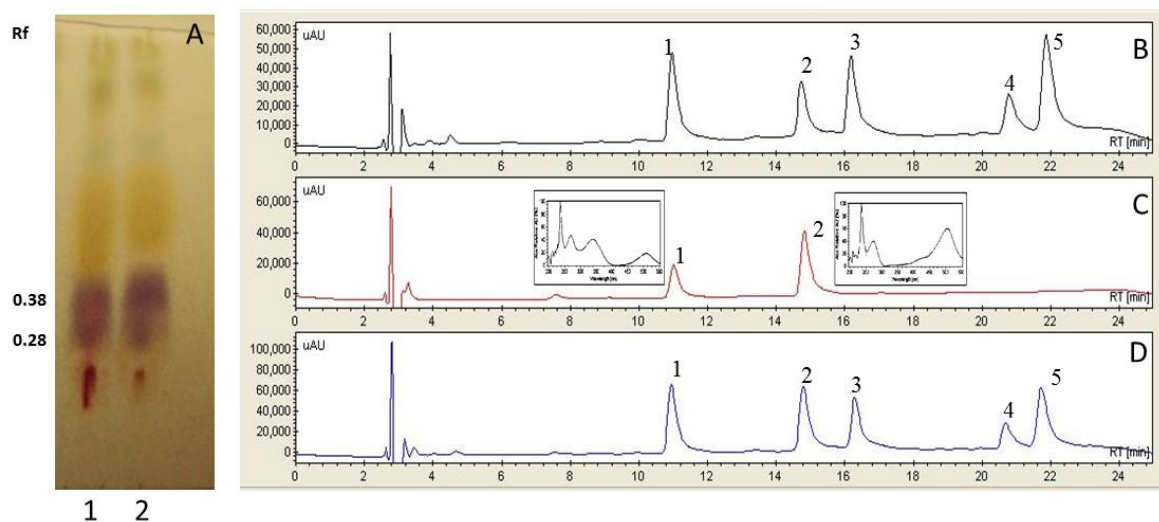


Figura 18. Identificación de antocianinas en extractos de hoja de *J. curcas*, variedad I-52. A. Por HPTLC sin revelar (placas de HPTLC de sílice 60 F₂₅₄ desarrolladas en la fase móvil BAW). Carriles: 1 y 2 corresponden al extracto hidrolizado de hoja. B-D. Por HPLC (detección a 520 nm). Los Cromatogramas B-D fueron obtenidos utilizando como fase móvil acetonitrilo y 10% ácido acético, 5% acetonitrilo y 1% ácido fosfórico en agua . B. Extracto hidrolizado de uva; C. Extracto hidrolizado de hoja de *J. curcas* y D. Co-elución del extracto de uva y *J. curcas*. Picos: (1) delfinidina, (2) cianidina, (3) petunidina, (4) peonidina y (5) malvidina. Figura Insertada: espectro de UV de los picos 1 y 2.

6.6 Identificación de lupeol en diferentes tejidos de plantas de *J. curcas*

El análisis de HPTLC muestra la posible presencia de triterpenos en extractos de tallo, peciolo y hoja (Figura 19A). Se observa una banda color violeta con R_f 0.33 en los extractos de tallo, peciolo y hoja, los cuales coinciden con el R_f del estándar de lupeol (std Lu, R_f 0.51), lo que sugiere la presencia de lupeol. En la Figura 19 B se observa que el lupeol es más abundante en las hojas comparadas con el peciolo y el tallo. El orden cuantitativo de la presencia de Lu es hoja > peciolo > tallo.

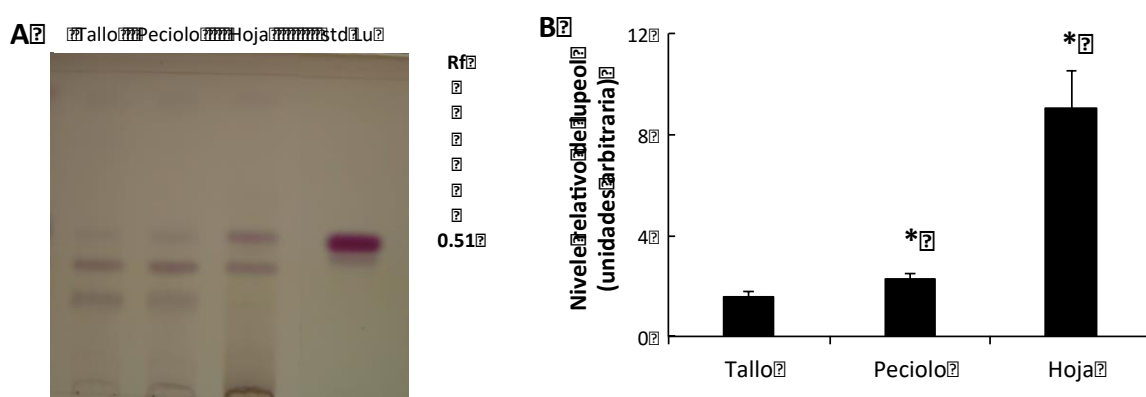


Figura 19. HPTLC de lupeol en tallo, peciolo y hoja. A. Placa de HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ revelada con anisaldehído y H₂SO₄; se usó la fase móvil hexano: acetona, 9:1. Std Lu: estándar de lupeol. B. valores arbitrarios de lupeol obtenidos del análisis de HPTLC de extractos de tejido de tallo, peciolo y hoja (200 mg/PS). Los valores de Lu representados son los determinados mediante la densidad relativa de las bandas del compuesto de los extractos con respecto al fondo utilizando el programa JustTLC versión 4.0.3. Los valores promedio de cada extracto (n= 2) con * son significativamente diferentes con una P < 0.05) de acuerdo al estimador Tukey.

El cromatograma de HPLC del extracto de hoja muestra un pico (1) eluido en un tiempo de retención (t_R) de 18.05 min (1) (Figura 20), el cual presenta una concentración de $71.48 \pm 1.00 \mu\text{g/g}$ PS. La presencia de este compuesto se confirmó por la comparación con el tiempo de retención del estándar de lupeol. Por análisis fitoquímicos de la corteza del tallo de *J. curcas*, se ha reportado la presencia de triterpenos de tipo ursano (ácido oleanólico) y lupano (lupeol) según Falodun et al. (2011).

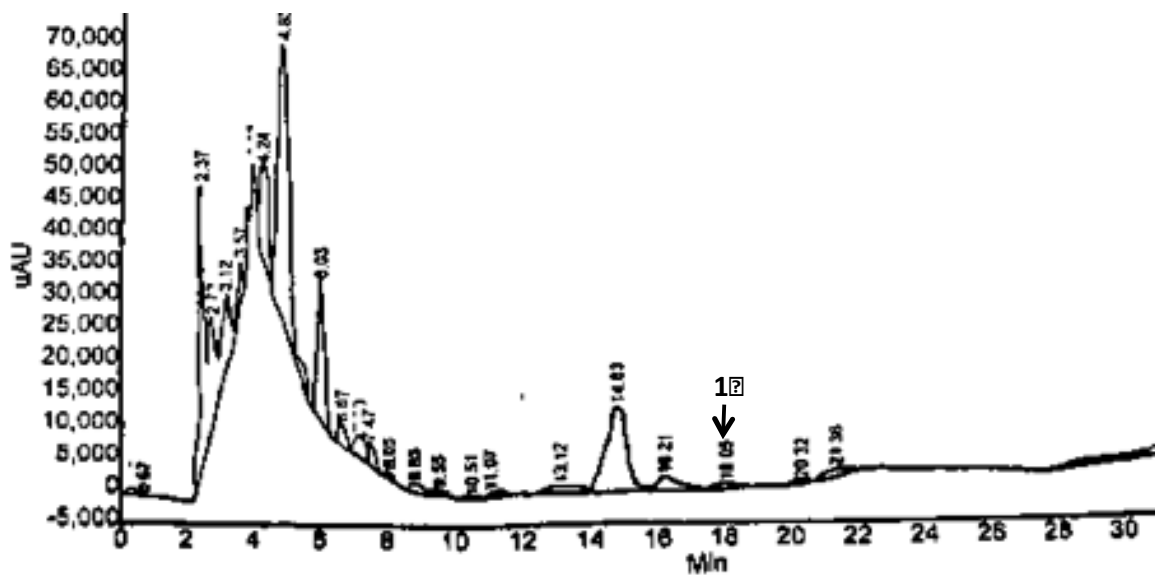


Figura 20. Cromatograma del extracto de hoja de *J. curcas* obtenido luego de la separación de HPLC, donde se muestra la identificación de lupeol (1, $t_R = 18.05$ min detectado a 205 nm) utilizando como fase móvil metanol y agua en una relación 90 :10.

6.7 Cultivos *in vitro*: Inducción de brotes, cultivo de callos y células en suspensión

6.7.1 Inducción de brotes

Para la inducción de brotes, los cotiledones y nodos fueron utilizados como explantes. El material vegetal fue cultivado en un medio conteniendo BAP 2.5 μM y CuSO_4 1.5 μM por 42 d. La respuesta de inducción de brotes dependió significativamente ($P < 0.05$) del tipo de explante (Tabla 15). En las observaciones realizadas a los 10 d de cultivo, los nodos y cotiledones mostraron una respuesta temprana en la formación de callo. La iniciación de brotes en los segmentos nodales y cotiledonales fue a los 21 d y 27 d respectivamente (Figura 21A y B). Los cotiledones presentaron una mayor respuesta en la inducción de brotes en comparación con los nodos después de 42 d de cultivo (Figura 21C). Los resultados son aceptables con lo reportado por Mazumdar et al. (2010) y Kaewpoo y Te-chato (2009) donde proponen que los tejidos más jóvenes muestran un mayor potencial en la inducción de brotes comparado a los tejidos más viejos, debido a que la formación de *novo* de los brotes estaría en función de los niveles hormonales de los tejidos.

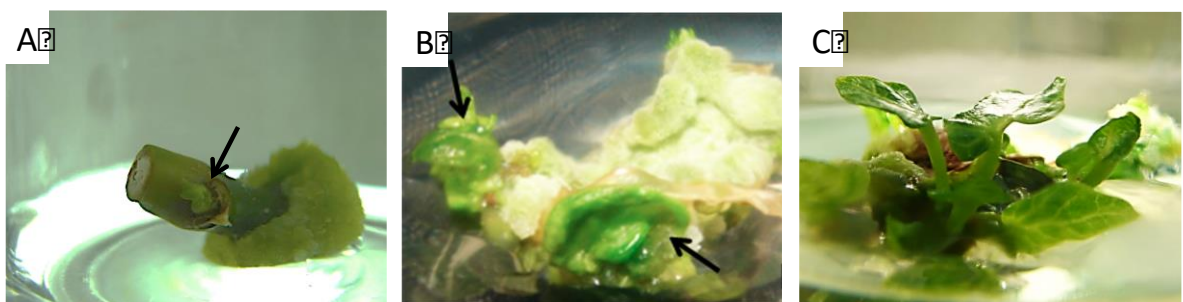


Figura 21. Brotes de *J. curcas*, variedad Chiapas obtenidos *in vitro*. A. Presencia de brotes en explante de nodos después de 21 d. B. Presencia de brotes en explante de hoja después de 27 d. C. Brotes desarrollados en explante de hoja a los 42 d. Los explantes de nodo y hoja fueron cultivados en medio B5 suplementado con BAP 2.5 μM y CuSO_4 1.5 μM .

Tabla 15. Efecto del tipo de explante y tipo de medio en la inducción de brotes de *J. curcas* después de 42 d.

Explante	Tipo de medio	Número brotes/explante
Cotiledón (abaxial)	B5	3.33 ± 0.76 ^a
Cotiledón (adaxial)	B5	1.67 ± 0.58 ^b
Nodo	B5	1.67 ± 0.29 ^b
Cotiledón (abaxial)	MS	1.83 ± 0.29 ^b

Los explantes fueron cultivados en medio B5 con 3% de sacarosa, 2.5 µM de BAP y 1.5 µM de CuSO₄ en condiciones de fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad). Los valores representados son la media (n= 3) ± DE. Las letras diferentes (a ó b) indican diferencia significativa entre el tipo de explante de acuerdo al estimador Tukey (P < 0.05).

La inducción de brotes no solo depende de la edad de la hoja, también es determinante la forma (orientación) en la que el explante es colocado en el medio (Bhatia et al., 2005). Por tal razón, se evaluó el efecto de la posición abaxial y adaxial de los cotiledones al estar en contacto con el medio (Tabla 15). Los mejores resultados fueron obtenidos en los cotiledones colocados en posición abaxial al estar en contacto con el medio; la respuesta en la formación de brotes fue dos veces mayor que los cotiledones colocados en forma adaxial. Observaciones similares han sido reportadas con respecto a la respuesta del lado abaxial en la inducción de brotes, donde se atribuye que la respuesta eficiente de la posición abaxial está en función de su superficie de contacto con el medio (Mazumdar et al., 2010).

Con el objetivo de evaluar el efecto del medio en la formación de brotes, el medio basal B5 fue comparado con el medio MS. Después de 42 d de cultivo el número de brotes en promedio fue de 1.83 a 2.83 por explante. El medio B5 favoreció significativamente (P < 0.05) la formación de brotes en comparación al medio MS (Tabla 15). La respuesta diferencial de los medios en la inducción de brotes quizá se deba a la composición química

de cada uno (Anexo, Tabla 1). La relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ es un factor importante en la toma de nitrógeno y regulación del pH durante el crecimiento del cultivo (Fracaro y Echeverrigaray 2001). Por tanto, la baja relación de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en el medio B5 favoreció la mayor inducción de brotes en *J. curcas*.

Una vez elegido el tipo de medio y el mejor explante se evaluó el efecto de BAP, combinación de citocininas, IBA y cobre con el objetivo de encontrar la condición adecuada para obtener la mayor inducción de brotes (Tabla 16). La formación de brotes dependió del tipo del regulador y su combinación. En medio con BAP 2.5 μM se observó la mayor inducción de brotes (4.5 brotes por explante) en comparación con medios que contenían otras concentraciones de BAP (3.1 y 13.3 μM). Sin embargo, la inducción de brotes en los medios con BAP 2.5 μM y CuSO_4 fue significativamente diferente a otros tratamientos con otras citocininas (KIN y TDZ). En medio con TDZ e IBA los explantes de hoja no sufrieron cambios morfogénicos; sin embargo, en medio con BAP 2.5 μM si se indujo la formación de brotes. BAP induce eficientemente la formación de brotes en diferentes tipos de tejidos de *J. curcas* comparado al efecto de KIN, TDZ e IBA (Sujatha y Dhingra 1993; Sujatha et al., 2005; Purkayastha et al., 2010). Aunque, el cobre es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo idóneo de la planta, el cual toma parte en los procesos fisiológicos. Un exceso del cobre conduce a diversos desórdenes en la planta como inhibición en el crecimiento y reducción en la biomasa (Zenk 1996). Probablemente la concentración 1.5 μM de cobre al medio fue alta para los explantes de hoja que impidió una mejor respuesta en la generación de brotes. Los brotes crecidos en medio B5 con BAP 2.5 μM fueron cultivados con 2.5 μM IBA para su posible enraizamiento lo que no ocurrió, sólo después de 30 d se formaron callos en la base del brote.

Tabla 16. Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de brotes de *J. curcas* a partir de explantes de cotiledón cultivado de forma abaxial después de 42 d.

Reguladores de crecimiento (μM)		Número de brotes/explante
BAP 2.5		$4.50 \pm 1.00^{\text{a}}$
BAP 3.1		$1.17 \pm 0.29^{\text{c}}$
BAP 13.3		$0.67 \pm 0.29^{\text{c}}$
BAP 2.5 + CuSO_4		$2.83 \pm 0.29^{\text{b}}$
BAP 2.5	KIN 0.4	$1.17 \pm 0.76^{\text{c}}$
BAP 2.5	KIN 0.9	$1.33 \pm 0.76^{\text{c}}$
BAP 2.5	TDZ 2.3	$0.50 \pm 0.50^{\text{c}}$
TDZ 0.9	IBA 0.9	$0.00 \pm 0.00^{\text{d}}$
TDZ 2.3	IBA 0.9	$0.00 \pm 0.00^{\text{d}}$

Los valores representados son la media ($n= 3$) \pm DE. Las letras diferentes (a-d) indican diferencia significativa entre cada tratamiento de acuerdo al estimador Tukey ($P<0.05$). El tratamiento con CuSO_4 contenía $1.5 \mu\text{M l}^{-1}$.

6.7.2 Cultivo de callos

Para la inducción de los callos de *J. curcas*, la hoja fue utilizada como explante donde se evidenció la presencia de un triterpeno pentacíclico, lupeol (Figura 19 y 20) el cual incrementa el valor biotecnológico del cultivo.

Los explantes fueron cultivados en el medio B5 suplementado con picloram 4.1 μM y PVP 0.4% en condición de fotoperiodo y oscuridad por 28 d (Tabla 17). A los siete días de cultivo se inició la formación de callo en la superficie del explante. Los callos iniciados en condiciones de oscuridad mostraron una apariencia semifrías comparable con los callos formados en fotoperiodo después de 28 d (Tabla 17). Resultados similares fueron reportados en *Cycas revoluta*, el endospermo cultivado con 10 μM de picloram en condición de oscuridad desarrolló callos frías en comparación con los explantes cultivados en fotoperiodo (Kiong et al., 2008). Tal vez en los explantes de hoja de *J. curcas* cultivados en oscuridad el picloram no fue rápidamente degradado, debido a que la degradación de los reguladores de crecimiento sintéticos en condiciones de oscuridad es más lenta que en condiciones de luz, lo cual permite una mayor translocación del regulador a la célula (Ibrahim y Debergh 2001; Kiong et al., 2008).

Tabla 17. Efecto de la condición fotoperiodo y oscuridad en la morfología del callo a partir de explantes de hoja de *J. curcas*.

Condición de crecimiento	Tipo de medio	Morfología
Fotoperiodo (16/8)	B5	Callo duro, color verde de crecimiento rápido
Oscuridad	B5	Callo semifriable, cremoso de rápido crecimiento
Oscuridad	MS	Callo semifriable, blanco de crecimiento lento

Las observaciones de la morfología de los callos corresponden a tres réplicas de cada tratamiento durante 4 semanas de cultivo.

Se comparó el efecto de los medios B5 y MS, ambos suplementados con picloram (4.1 μM) y PVP (0.4 %) en condición de oscuridad sobre la morfología del callo (Tabla 17). El medio B5 fue más adecuado para un rápido desarrollo del callo que el medio MS. Se ha reportado que el balance de los reguladores de crecimiento endógenos del explante y los componentes del medio son determinantes en la desdiferenciación de las células (Skoog y Miller 1957). En la figura 22 A-C se muestra la apariencia de los callos formados a partir de explantes de hojas en *J. curcas* cultivados en medio B5 y MS por 28 d. El medio B5 fue elegido para los siguientes experimentos.

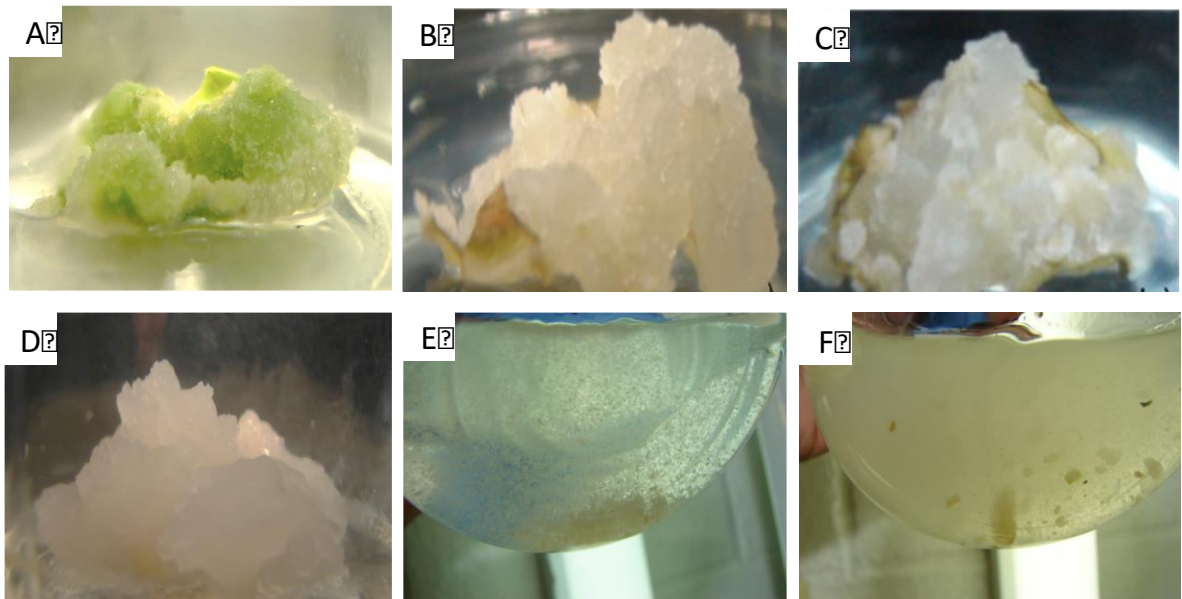


Figura 22. Cultivo de callos (A-D) y células en suspensión (E y F). A. Callos crecidos en fotoperiodo (medio B5). B. Callos crecidos en oscuridad (medio B5). C. Callos crecidos en oscuridad (medio MS). Los cultivos de A-C fueron cultivados en un medio suplementado con 4.1 μM de picloram y 0.4% de PVP. D. Callo crecido en oscuridad en medio B5 suplementado con picloram (8.3 μM) y ANA (5.4 μM). Cultivo de células en suspensión después de tres resiembras crecidas en medio B5 suplementados con: E. 4.1 μM de picloram y 2.7 de ANA y F. 8.3 μM de picloram y 5.4 μM de ANA.

Después de haber obtenido el tipo de medio y la condición para el desarrollo del callo en explantes de hoja, se planteó evaluar el efecto de otras concentraciones de picloram en combinación con ANA para la obtención de callo friable en explantes de hoja de *J. curcas*. En la Tabla 18 se presenta el efecto en la formación de callos del picloram de 2.1 a 8.3 μM en combinación con 2.7 o 5.4 μM de ANA. Los medios que contenían picloram 8.3 μM y ANA 5.4 μM presentaron una mayor friabilidad (Figura 22D) que los explantes cultivados en picloram 4.1 μM y ANA 2.7 μM . En los otros tratamientos, los callos mostraron una apariencia dura y de color blanco. Estos resultados son aceptables con lo observado en

otras especies de plantas, donde han demostrado el efecto del picloram y ANA en la iniciación y mantenimiento de callos friables (Hagen et al., 1990; Kiong et al., 2008; Şener et al., 2008; Nurazah et al., 2009). Los callos bajo estas condiciones fueron utilizados para el establecimiento del cultivo de células de *J. curcas*.

Tabla 18. Efecto de diferentes concentraciones de picloram y ANA en la morfología de callos derivados de hoja de *J. curcas* a los 28 d.

Reguladores de crecimiento (μM)		Morfología
Picloram	NAA	
2.1	2.7	Duro, compacto de color cremoso
2.1	5.4	Duro, compacto de color cremoso
4.1	2.7	Semifriable, compacto, de color cremoso
4.1	5.4	Duro, compacto de color cremoso
8.3	2.7	Duro, compacto de color cremoso
8.3	5.4	Friable, globular de color cremoso

Las observaciones de la morfología de los callos corresponden a tres réplicas de cada tratamiento durante 4 semanas de cultivo.

Con el objetivo de iniciar el cultivo de células en suspensión de *J. curcas*, los callos friables crecidos en el medio B5 con 4.1 μM de picloram y 2.7 μM de ANA y 2% de sacarosa fueron transferidos al mismo medio de cultivo basal con la misma concentración de auxinas (4.1 μM de picloram y 2.7 μM de ANA) y también al medio suplementado con 8.3 μM de picloram y 5.7 μM de ANA (Figura 22F). Los callos cultivados en medio suplementado con 4.1 μM de picloram y 2.7 μM de ANA mostraron un alto grado de disgregabilidad, lo cual permitió obtener un cultivo de células en suspensión homogéneo después de tres resiembras de 10 días (Figura 22E).

6.7.3 Cultivo de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión fueron utilizados para evaluar el efecto de elicitores abióticos (PEG, H₂O₂, BSO y la combinación BSO-H₂O₂) sobre la producción de triterpenos pentacíclicos después de 120 h de elicitación.

En las células de *J. curcas*, la elicitación en el día 7 con PEG 5 y 10% incrementó la concentración de lupeol hasta 3.6 veces comparada al control, lo cual fue acompañado en ambos tratamientos de una reducción en la biomasa aproximadamente de 36% (Tabla 19). Se ha reportado que el PEG afecta el potencial osmótico de los nutrientes del medio, lo cual dificulta su disponibilidad para la célula (Burnett 2005).

En consecuencia, el PEG afecta los procesos bioquímicos y fisiológicos como la inhibición de la división y elongación celular (Heckenberger et al., 1998; Schuppler et al., 1998). Por otro lado, en genotipos de *Glycine max* se ha reportado que el estrés osmótico induce una acumulación del 16 % de triterpenoides, donde el lupeol fue el más abundante (Kim et al., 2007). Además se ha demostrado que el estrés osmótico induce la sobrerregulación de genes involucrados en la biosíntesis de triterpenos (Nasrollahi et al., 2014). Es importante mencionar que, la adición de PEG 15% en las células de *J. curcas* generó un ambiente citotóxico para el crecimiento del cultivo, resultando en la disminución de la biomasa en un 77%.

Los cultivos de células de *J. curcas* fueron elicitados con tres concentraciones de H₂O₂, 200 μM, 400 μM y 600 μM, para evaluar la producción de biomasa y triterpenos (Tabla 20). Los tratamientos con H₂O₂ 400 y 600 μM afectaron la biomasa por arriba del 50%, pero solo H₂O₂ 400 μM presentó una producción de lupeol y ácido betulínico significativamente diferente comparado al control. Sin embargo, la concentración más baja de H₂O₂ (200 μM) estimuló solo la producción de lupeol hasta 3.3 veces comparado al

control (de $172.77 \pm 35.22 \mu\text{g/g PS}$ a $578.25 \pm 94.94 \mu\text{g/g PS}$), la cual fue acompañada de un ligera reducción en la biomasa de 20% manteniendo una viabilidad celular del 85 %.

Table 19. Efecto de la concentración de PEG en la acumulación de biomasa y concentración de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de *J. curcas*.

Tratamiento	Biomasa (g PS/ L)	Contenido de triterpenos ($\mu\text{g/g PS}$)	
		Lupeol	Ácido betulínico
Control	14.52 ± 0.51	172.77 ± 35.22	299.48 ± 1.31
PEG 5%	$10.20 \pm 0.85^*$	$616.75 \pm 66.83^*$	0.00 ± 0.00
PEG 10%	$8.34 \pm 0.76^*$	$579.70 \pm 49.49^*$	0.00 ± 0.00

El elicitor fue adicionado el día 7 de crecimiento. Los datos fueron cuantificados 120 h después de la elicitación con PEG. Los valores representan la media \pm DE tomando tres réplicas. Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

Una respuesta temprana en las células de las plantas por efecto del elicitor es la generación de H_2O_2 intracelular, el cual puede inducir un estallamiento oxidativo y activar el proceso de muerte celular programada (Neill et al., 2002; Zhao et al., 2005b). Sin embargo, el H_2O_2 intracelular en bajas concentraciones es requerido en la regulación de procesos durante el crecimiento y desarrollo de la planta (por ejemplo el alargamiento celular), a través del control de la actividad de los canales de Ca^{2+} (Foreman et al., 2003); además, de estar involucrado en activación del mecanismo de defensa en respuesta al estrés (Miller et al., 2010).

Table 20. Efecto de la concentración de H₂O₂ en la acumulación de biomasa y producción de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de *J. curcas*.

Tratamiento	Biomasa (g PS/L)	Contenido de triterpenos (µg/g PS)	
		Lupeol	Ácido betulínico
Control	14.52 ± 0.51	172.77 ± 35.22	299.48 ± 1.31
H ₂ O ₂ 200 µM	10.32 ± 1.70*	578.25 ± 94.94*	235.69 ± 29.68
H ₂ O ₂ 400 µM	7.08 ± 0.85*	518.97 ± 70.93*	339.09 ± 28.64*
H ₂ O ₂ 600 µM	4.80 ± 0.68*	252.02 ± 72.61	189.55 ± 45.83

El elicitador fue adicionado el día 7 de crecimiento. Los datos fueron cuantificados 120 h después de la elicitación con H₂O₂. Los valores representan la media ± DE tomando tres réplicas. Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una P < 0.05.

La formación de H₂O₂ del estallamiento oxidativo provocado por elicitación con pectina cítrica en cultivos de células de *Panax ginseng* está involucrado en la biosíntesis de triterpenos (Hu *et al.*, 2003). Además, en cultivos de células de *J. curcas* elicitadas con AJ se encontró que el incremento en la producción de triterpenos (lupeol y ácido betulínico) estuvo asociado a altos niveles de H₂O₂ intracelular (Zaragoza-Martínez *et al.*, 2016). Por tanto, la adición de H₂O₂ a los cultivos de *J. curcas* (JC-Pale) estaría favoreciendo la biosíntesis de triterpenos probablemente por la participación del AJ endógeno.

Con el objetivo de explorar si el BSO favorece la producción de triterpenos, los cultivos de las células de *J. curcas* fueron elicitadas con diferentes concentraciones de BSO (200, 400, 600, 800 µM) durante 120 h de tratamiento (Tabla 21). La aplicación de BSO a los cultivos indujo una producción diferencial en lupeol y ácido betulínico, sin cambios significativos en la biomasa.

Se ha reportado que en las plantas, el glutatión reducido (GSH) está involucrado en los mecanismos de regulación de la división celular (Sánchez-Fernández et al., 1997; Vernoux et al., 2000; Vivancos et al., 2010). Además, altos niveles de GSH durante la fase de división son determinantes para mantener un balance redox y favorecer la disminución de la señalización oxidativa bajo la exposición de BSO, inhibidor específico de la γ -glutamylcisteina sintetasa (Vernoux et al., 2000; Vivancos et al., 2010). Probablemente el cultivo de células de *J. curcas* esté incrementando los niveles de GSH y otros metabolitos antioxidantes para disminuir el ambiente oxidante creado por el BSO.

Las células tratadas con BSO 200 μ M incrementaron moderadamente la concentración de lupeol de 172.77 ± 35.22 μ g/g PS a 266.06 ± 2.82 μ g/g PS, pero la adición de BSO 800 μ M incrementó significativamente la acumulación de lupeol de 2.9 veces comparada al control (de 172.77 ± 35.22 μ g/g PS a 496.96 ± 17.65 μ g/g PS).

Por lo contrario, la elicitación con BSO 600 μ M estimuló significativamente la concentración de ácido betulínico 4.2 veces (722.24 ± 78.44 μ g/g PS) mientras que el contenido de lupeol alcanzó un incremento de 1.9 veces (331.78 ± 18.29 μ g/g PS) comparado al control (172.77 ± 35.22 μ g/g PS). En otros cultivos de células el BSO induce el incremento de metabolitos secundarios asociados al estrés oxidativo (Berglund y Ohlsson 1993; Guo y ohta 1993; Guo et al., 1993). En las células de *J. curcas* la elicitación con BSO está favoreciendo un ambiente adecuado para llevar a cabo la biosíntesis de ácido betulínico vía oxidación en el C-28 del lupeol.

Table 21. Efecto de la concentración de BSO en la acumulación de biomasa y producción de triterpenos pentacíclicos en cultivo de células de *J. curcas*.

Tratamiento	Biomasa (g PS/L)	Contenido triterpenos ($\mu\text{g/g PS}$)	
		Lupeol	Ácido betulínico
Control	14.52 \pm 0.51	172.77 \pm 35.22	299.48 \pm 1.31
BSO 200 μM	12.84 \pm 1.53	266.06 \pm 2.82 *	291.17 \pm 45.31
BSO 400 μM	14.16 \pm 1.02	141.78 \pm 2.89	241.7 \pm 3.12*
BSO 600 μM	15.00 \pm 0.85	331.78 \pm 18.29*	722.24 \pm 78.44*
BSO 800 μM	15.60 \pm 1.02	496.96 \pm 17.65*	154.63 \pm 0.84*

El elicitador fue adicionado el día 7 de crecimiento. Los datos fueron cuantificados 120 h después de la elicitación con BSO. Los valores representan la media \pm DE tomando tres réplicas. Los valores promedio con * son significativamente diferentes de acuerdo al estimador Tukey con una $P < 0.05$.

Se realizó una evaluación del efecto de la combinación de BSO 600 μM y H_2O_2 (200 y 400 μM) en el cultivo de células de *J. curcas*. La combinación BSO 600 μM y H_2O_2 200 μM incrementó la concentración de lupeol de 172.77 \pm 35.22 $\mu\text{g/g PS}$ a 466.92 \pm 57.27 $\mu\text{g/g PS}$, lo cual equivale a 2.7 veces comparado al control. Por otro lado, la combinación BSO 600 μM y H_2O_2 400 μM estimuló la producción de ácido betulínico 1.6 veces comparado al control (299.48 \pm 1.31 $\mu\text{g/g PS}$ a 476.78 \pm 31.46 $\mu\text{g/g PS}$). Es importante mencionar que la acumulación de triterpenos por el efecto de la combinación de elicitores fue menor comparada a los tratamientos individuales (Tabla 20 y 21). Este efecto también ha sido reportado en células de *Daucus carota* donde la producción de metabolitos secundarios como 6-metoximeleina inducida por la combinación de BSO- H_2O_2 fue menor al tratamiento individual con BSO (Guo et al., 1993).

7. Conclusiones

- En las plantas de la variedad I-Chiapas expuestas a frío (10 °C) después de 48 h, los flavonoides fueron inducidos (1.4 veces) en respuesta a la acumulación de H₂O₂.
- Las hojas de la variedad I-Chiapas incubadas con ABA y posteriormente expuestas a frío (10 °C) mostraron *in situ* un incremento en la intensidad de la fluorescencia de los flavonoides asociado a una disminución del 80% en los niveles de H₂O₂.
- La acumulación y el perfil de flavonoides dependió de la concentración de AJ aplicada en el área foliar de las plantas I-64. Bajo el efecto de AJ 1 mM las plantas de la variedad I-52 y I-64 mostraron una acumulación diferencial en el contenido de kaempferol, apigenina, vitexina, isovitexina y antocianinas que correspondió a un incremento de la actividad de la PAL después de 120 h .
- La aplicación exógena de AJ a las plantas de la variedad I-52 expuestas a frío (5 °C) y tratadas con sacarosa 300 mM favoreció la acumulación de flavonoides y antocianinas respectivamente, así como la respuesta antioxidante enzimática (CAT y APX).
- El explante de hoja y el medio basal B5 con los reguladores de crecimiento como BAP (2.5 μM) y la combinación de Picloram (8.3 μM) y NAA (5.4 μM) favorecieron la inducción de brotes y callos friables en *J. curcas* respectivamente.
- En el cultivo de células de *J. curcas*, la adición de H₂O₂ y BSO estimuló la producción de triterpenos pentacíclicos, donde 200 μM de H₂O₂ incrementa la acumulación de lupeol, mientras que 600 μM de BSO favoreció la producción de ácido betulínico.

8. Bibliografia

- Adb-Alla H., Moharram F. A., Gaara A. H., El-Saffy M.M. (2009). Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L. leaves and their immunomodulatory activity on humoral and cell-mediated immune response in chicks. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64: 495-501.
- Adebowale K. O., Adedire C. O. (2006). Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *African Journal of Biotechnology* 5: 901–906.
- Agati G., Matteini P., Goti A., Tattini M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, 174: 77-89.
- Agati G., Stefano G., Biricolti S., Tattini M. (2009). Mesophyll distribution of ‘antioxidant’ flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany*, 104: 853-861.
- Alam M. M., Nahar K., Hasanuzzaman M., Fujita M. (2014). Exogenous jasmonic acid modulates the physiology, antioxidant defense and glyoxalase systems in imparting drought stress tolerance in different *Brassica* species. *Plant Biotechnology Reports*, 8: 279-293.
- Alvero-Bascos E. M., Ungson L. B. (2012). Ultraviolet-B (UV-B) Radiation as an elicitor of flavonoid production in callus cultures of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *The Phillipine Agricultural Scientist*, 95: 335-343.
- Allen D. J., Ort D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6: 36-42.

- Anjum S. A., Wang L., Farooq M., Khan I., Xue L. (2011). Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197: 296-301.
- Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Avanci N. C., Luche D. D., Goldman G. H., Goldman M. H. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics Molecular Research*, 9: 484-505.
- Awasthi R., Bhandari K. K., Nayyar H. (2015). Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, 3: 11.
- Azevedo H., Amorim-Silva V., Tavares R. M. (2009). Effect of salt on ROS homeostasis, lipid peroxidation and antioxidant mechanisms in *Pinus pinaster* suspension cells. *Annals of Forest Science*, 66:1-9..
- Benhamou N (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Science*, 1: 233-240.
- Bernabé-Antonio A., Álvarez L., Buendía-González L., Maldonado-Magaña A. Cruz-Sosa F. (2015). Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120: 221-228.
- Berglund T., Ohlsson A. B. (1993). The glutathione biosynthesis inhibitor buthionine-sulfoximine (BSO) induces cardenolide accumulation in *Digitalis lanata* tissue culture. *Journal of Plant Physiology*, 142: 248-250.
- Bhatia P., Ashwath N., Midmore D.,J (2005). Effects of genotype, explant orientation and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 457–464.

- Brown G. D. (1998). The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports*, 15: 653-696.
- Burnett S., van Iersel M., Thomas P. (2005). PEG-8000 alters morphology and nutrient concentration of hydroponic impatiens. *Horticultural Science*, 40: 1768-1772.
- Campos M. L., Hsie B. S., Granja J. A., Correia R. M., Almeida-Cortez J. S., Pompelli M. F. (2012) Photosynthesis and antioxidant activity in *Jatropha curcas* L. under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24: 55-67.
- Campos P. S., Quartin V., Ramalho J. C., Nunes M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 283-292.
- Chalker-Scott L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 1-9.
- Chalker-Scott L. (2002). Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?. *Advances in Botanical Research*, 37: 103-127.
- Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
- Chhabra S. C., Mahunnah R. L., Mshiu, E. N. (1990). Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. III. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 28: 255-283.
- Cho D., Shin D., Jeon B. W., Kwak J. M. (2009). ROS-mediated ABA signaling. *Journal of Plant Biology*, 52: 102-113.
- Correa S. M., Atehortúa L. (2012). Lipid profile of *in vitro* oil produced through cell culture of *Jatropha curcas*. *Journal of AOAC International*, 95: 1161-1169.

- Creelman R. A., Mullet J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48: 355-381.
- Crifò T., Puglisi I., Petrone G., Recupero G. R., Lo Piero A.R., (2011) Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: implication of the flavonoid biosynthetic pathway. *Gene* 478: 1–9.
- Cui X. H., Murthy H. N., Wu CH., Paek KY. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103: 7-14.
- de Abreu I. N., Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 241-248.
- Debeaujon I., Peeters A. J., Léon-Kloosterziel K. M., Koornneef M. (2001). The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *The Plant Cell*, 13: 853-871.
- Debnath M., Bisen P. S. (2008) *Jatropha curcas* L., A multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9: 288-306.
- Devoto A., Turner J. G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany*, 92: 329-337.
- Divakara B. N., Upadhyaya H. D., Wani S. P., Gowda C. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy*, 87: 732-742.
- Dixon R. A., Paiva N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1085-1097.

- Dixon R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165: 9-28.
- Du H., Liu H., Xiong L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in Plant Science*, 4: 397.
- Dugo P., Favoino O., Presti M. L., Luppino R., Dugo G., Mondello L. (2004). Determination of anthocyanins and related components in red wines by micro-and capillary HPLC. *Journal of Separation Science*, 27: 1458-1466.
- Dugo P., Mondello L., Morabito D., Dugo G. (2003). Characterization of the anthocyanin fraction of sicilian blood orange juice by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1173-1176.
- Durst R. W., Wrolstad R. E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., Eds.; John Wiley and Sons: New York. pp F1.3.1 -F1.3.13.
- Ebuehi O. A., Okorie, N. A. (2009). Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*, 19: 200-205.
- El-Baz F., Aly H., Abd-Alla H., Saad S. (2014). Bioactive flavonoid glycosides and anti-diabetic activity of *Jatropha curcas* on streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*, 29: 143-156.
- Elfahmi A., Ruslan K. (2011). Phytochemical study of *Jatropha curcas* cell culture. *Biotropia*, 18: 42-49.

- Erlejman A. G., Verstraeten S. V., Fraga C. G., Oteiza P. I. (2004). The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radical Research*, 38: 1311-1320.
- Falodun A., Nworgu Z. A. M., Osayemwenre E. (2011). Smooth muscle relaxant evaluation of *Jatropha Curcas* Linn (Euphorbiaceae) and isolation of triterpenes. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 26: 133-137.
- Ferrer J. L., Austin M. B., Stewart C., Noel J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 356-370.
- Fini A., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Tattini M. (2011). Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6: 709-711.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies, J. M., Dolan L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442-446.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005a). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1056-1071.
- Foyer C. H., Noctor G. (2005b). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17: 1866-1875.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view

from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion and Plant Biology*, 9: 436-442.

Fracaro F., Echeverrigaray S. (2001). Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 1-4.

Gadzovska S., Maury S., Delaunay A., Spasenoski M., Joseph C., Hagège, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89: 1-13.

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.

Gao J., Jiang N., Qin X., Zhu X., Ai T., Peng T., Peng T., Wu J., Xu Y., Chen, F. (2013). Physiological and metabolic responses of *Jatropha* to chilling stress. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15: 871-877.

Gao S., Ouyang C., Wang S., Xu Y., Tang L., Chen F. (2008). Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil and Environment*, 54: 374–381.

Garbero M., Pedranzani H., Zirulnik F., Molina A., Pérez-Chaca M. V., Vigliocco A., Abdala G. (2011). Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 497-507.

Gill S. S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.

Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.

- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J. M., Lloyd A. M. (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 53: 814-827.
- Gould K. S., McKelvie J., Markham K. R. (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1261-1269.
- Gundlach H., Müller M. J., Kutchan T. M., Zenk M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 2389-2393.
- Guo R., Yuan G., Wang Q. (2011). Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chemistry*, 129:1080-1087.
- Guo Z., Ou W., Lu S., Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 828-836.
- Guo Z. J., Nakagawara S., Sumitani K., Ohta Y. (1993). Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxymellein in cultured carrot (*Daucus carota*) cells. *Plant Physiology*, 102: 45-51.
- Guo Z. J., Ohta Y. (1993). A synergistic effect of glutathione-depletion and elicitation on the production of 6-methoxymellein in carrot cells. *Plant Cell Reports*, 12: 617-620.
- Haas W., Sterk H., Mittelbach M. (2002). Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. *Journal of Natural Products*, 65: 1434-1440.
- Hagen S. R., LeTourneau D., Muneta P., Brown J. (1990). Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. *Plant Growth Regulation*, 9: 341-345.

- Hara M., Oki K., Hoshino K., Kuboi T. (2004). Effects of sucrose on anthocyanin production in hypocotyl of two radish (*Raphanus sativus*) varieties. *Plant Biotechnology*, 21: 401-405.
- Harborne J. B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids. New York: Academic Press. 383 p.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Hariyadi P., Parkin K. L. (1991). Chilling-induced oxidative stress in cucumber fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 1: 33-45.
- Harrison M. A. (2012). Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions, in: Khan N. A., Nazar R., Iqbal N., Anjum N. A. (Eds.), *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 49–76.
- Havaux M., Eymery F., Porfirova S., Rey P., Dörmann P. (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17: 3451-3469.
- Havaux M., Kloppstech K. (2001). The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta*, 213: 953-966.
- Heath R. L., Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- Heckenberger U., Roggatz U., Schurr U. (1998). Effect of drought stress on the cytological status in *Ricinus communis*. *Journal of Experimental Botany*, 49: 181-189.
- Hendrich A. B. (2006). Flavonoid–membrane interactions: possible consequences for

biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 27: 27–40.

Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in Plant Science*, 14:125-132.

Herrera J. M., Ayala A. L. M., Makkar H., Francis G., Becker K. (2010). Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research*, 39: 396-407.

Hill R. A., Connolly J. D. (2015). Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 32: 273-327.

Horbowicz M., Wiczowski W., Koczkodaj D., Saniewski M. (2011). Effects of methyl jasmonate on accumulation of flavonoids in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Acta Biologica Hungarica*, 62: 265-278.

Hu X., Neill S., Cai W., Tang Z. (2003). Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Physiologia Plantarum*, 118: 414-421.

Hu Y., Jiang L., Wang F., Yu D. (2013). Jasmonate regulates the inducer of cbf expression—C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25: 2907-2924.

Huang M., Guo Z. (2005). Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum*, 49: 81-84.

Huang Q., Guo Y., Fu R., Peng T., Zhang Y., Chen F. (2014). Antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Jatropha curcas*. *Science Asia*, 40: 193-197.

Hughes N. M., Carpenter K. L., Cannon J. G. (2013). Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. *Journal of Plant Physiology*, 170: 230-233.

- Hung K. T., Cheng D. G., Hsu Y. T., Kao C. H. (2008). Abscisic acid-induced hydrogen peroxide is required for anthocyanin accumulation in leaves of rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1280-1287.
- Hung K. T., Hsu Y. T., Kao C. H. (2006). Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Physiologia Plantarum*, 127: 293-303.
- Ismail A., Riemann M., Nick P. (2012). The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *Journal of Experimental Botany*, 63:2127-2139.
- Ibrahim R., Debergh P. C. (2001). Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Scientia Horticulturae*, 88: 41-57.
- Janská A., Maršík P., Zelenková S., Ovesna J. (2010). Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, 12: 395-405.
- Kaewpoo M., Te-chatob S. (2009). Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. *Science Asia*, 35: 353-357.
- Kanno C., Yamauchi K. (1977). Application of a new iron reagent, 3-(2-pyridyl)-5, 6-diphenyl-1,2,4-triazine, to spectrophotometric determination of tocopherols. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41: 593-596.
- Karuppusamy S. (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 1222-1239.
- Kauss H., Jeblick W., Ziegler J., Krabler W. (1994). Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. *Plant Physiology*, 105: 89-94.
- Kazan K., Manners J. M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiology*, 146: 1459-1468.

- Khan M. I. R., Khan N. A. (2013). Salicylic acid and jasmonates: approaches in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 1: e113.
- Khan M. I. R., Syeed S., Nazar R., Anjum N. A. (2012). An insight into the role of salicylic acid and jasmonic acid in salt stress tolerance. In *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Khan N. A., Nazar R., Iqbal N., Anjum N. A., (eds). Springer Berlin Heidelberg. pp. 277-300.
- Kim J. S., Lee B. H., Kim S. H., Oh K. H., Cho K. Y. (2006). Responses to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in non-chlorophyllous corn (*Zea mays* L.) leaf. *Journal of Plant Biology*, 49: 16-25.
- Kim K. S., Park S. H., Kim D. K., Jenks M. A. (2007). Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *International Journal of Plant Sciences*, 168: 307-316.
- Kirakosyan A., Kaufman P., Warber S., Zick S., Aaronson K., Bolling S., Chul Chang S. (2004). Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiologia Plantarum*, 121: 182-186.
- Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P. B., Warber S., Bolling S., Chang S. C. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3973-3976.
- Kiong A. L. P., Thing Y. S., Gansau J. A., Hussein S. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4279-4284.
- Koehler G., Wilson R. C., Goodpaster J. V., Sønsteby A., Lai X., Witzmann F. A., You J.S., Rohloff J., Randall S.K., Alsheikh M. (2012). Proteomic study of low-temperature

responses in strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa*) that differ in cold tolerance. *Plant Physiology*, 159: 1787-1805.

Kolaksazov M., Laporte F., Ananieva K., Dobrev P., Herzog M., Ananiev E. D. (2013). Effect of chilling and freezing stresses on jasmonate content in *Arabis alpina*. *Bulgarian Journal Agricultural Science*, 19: 15-17.

Korn M., Peterek S., Mock H. P., Heyer A. G., Hinch D. K. (2008). Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 31: 813-827.

Krasensky J., Jonak C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1593-1608.

Kumar A., Sharma S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28: 1-10.

Kumar N., Pamidimarri S. D. V. N., Kaur M., Boricha G., Reddy M. P. (2008). Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. *Biologia*, 63: 378-382.

Kumari G. J., Reddy A. M., Naik S. T., Kumar S. G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C., Sudhakar C. (2006). Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum*, 50: 219-226.

Lackman P., González-Guzmán M., Tilleman S., Carqueijeiro I., Pérez A. C., Moses T., Seo, M., Kanno Y., Häkkinen S. T., Van Montagu M. C., Thevelein J. M., Maaheimo H., Oksman-Caldentey K. M., Rodriguez P. L., Rischer H., Goossens A. (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 5891-

5896.

Lama A. D., Kim J., Martiskainen O., Klemola T. Salminen J. P., Tyystjärvi E., Niemelä P., Vuorisalo T. (2016). Impacts of stimulate drought stress and artifical damage on concentrations of flavonoids in *Jatropha curcas* (L), a biofuel shrub. *Journal of Plant Research*, 129: 1141-1150.

Lans C., Harper T., George K., Bridgewater E. (2001) Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1: 10.

Lee D. H., Lee C. B. (2000). Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159: 75-85.

Li D. M., Guo Y. K., Li Q., Zhang J., Wang X. J., Bai J. G. (2012). The pretreatment of cucumber with methyl jasmonate regulates antioxidant enzyme activities and protects chloroplast and mitochondrial ultrastructure in chilling-stressed leaves. *Scientia Horticulturae*, 143: 135-143.

Liang Y., Chen H., Tang M. J., Yang P. F., Shen S. H. (2007). Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. *Physiologia Plantarum*, 131: 508-517.

Lichtenthaler H. K. (1998). The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 187-198.

Lin C. M., Huang S. T., Liang Y. C., Lin M. S., Shih C. M., Chang Y. C., Chen T.Y., Chen C. T. (2005). Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. *Planta Medica*, 71: 748-753.

Ling-yi K., Zhi-da M., Jian-xia S., Rui F. (1996). Chemical constituents from roots of *Jatropha curcas*. *Acta Botanica Sinica*, 38 (2): 161-166.

- Liu W., Zu Y. G., Fu Y. J., Kong Y., Ma W., Yang M., Li J., Wu, N. (2010). Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings. *Food Chemistry*, 121: 732-739.
- Liu X., Chi H., Yue M., Zhang X., Li W., Jia E. (2012). The regulation of exogenous jasmonic acid on UV-B stress tolerance in wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 436-447.
- Loreti E., Povero G., Novi G., Solfanelli C., Alpi A., Perata P. (2008). Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 179: 1004-1016.
- Macz-Pop G. A., Rivas-Gonzalo J. C., Pérez-Alonso J. J., González-Paramás A. M. (2006). Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94: 448-456.
- Maeda H., Song W., Sage T. L., DellaPenna D. (2006). Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 2710-2732.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Makkar H. P., Becker K., Schmook B. (1998). Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52: 31-36.
- Makkar H. P., Becker K., Sporer F., Wink M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3152-3157.
- Malinowska M, Sikora E, Ogonowski J (2013) Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. *Acta Biochimica Polonica* 60: 731-735.

- Martens S., Preuss A., Matern U. (2010). Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, 71: 1040-1049.
- Maruta T., Inoue T., Noshi M., Tamoi M., Yabuta Y., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. (2012). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding-and jasmonate-induced H₂O₂ in *Arabidopsis* plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820: 1901-1907.
- Mazumdar P., Basu A., Paul A., Mahanta C., Sahoo L. (2010). Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. *South African Journal of Botany*, 76: 337-344.
- McVean M., Xiao H., Isobe K. I., Pelling J. C. (2000). Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis*, 21: 633-639.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33: 453-467.
- Mitra C. R., Bhatnagar, S. C., Sinha, M. K. (1970). Chemical examination of *Jatropha curcas*. *Indian Journal Chemistry*, 8: 1047.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498.
- Moellering E. R., Muthan B., Benning C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330: 226-228.

- Mol J., Grotewold E., Koes R. (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science*, 3: 212-217.
- Montavon P., Kukic K. R., Bortlik K. (2007). A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. *Analytical Biochemistry*, 360: 207-215.
- Munemasa S., Hossain M. A., Nakamura Y., Mori I. C., Murata Y. (2011). The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiology*, 155: 553–561.
- Munné-Bosch S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162: 743-748.
- Munné-Bosch S., Alegre, L. (2002). Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS letters*, 524: 145-148.
- Mur L. A., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140: 249-262.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nakabayashi R., Yonekura-Sakakibara K., Urano K., Suzuki M., Yamada Y., Nishizawa T., Matsuda F., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K., Michael A. J., Tohge T., Yamasaki M., Saito K. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 77: 367-379.

- Namuli A., Abdullah N., Sieo C., Zuhainis S., Oskoueian E. (2011). Phytochemical compounds and antibacterial activity of *Jatropha curcas* Linn. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3982-3990.
- Nasrollahi V., Mirzaie-asl A., Piri K., Nazeri S., Mehrabi R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*, 103: 32-37.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237-1247.
- Neuwinger, H. D. (1994). Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte WV GesmbH, Germany. 450 p.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49: 249-279.
- Nurazah Z., Radzali M., Syahida A., Maziah M. (2009). Effects of plant growth regulators on callus induction from *Cananga odorata* flower petal explant. *African Journal of Biotechnology*, 8: 2740-2743.
- Openshaw K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19: 1-15.
- Orozco-Cárdenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13: 179-191.
- Orozco-Cárdenas M., Ryan C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 6553-6557.
- Oskoueian E., Abdullah N., Ahmad S., Saad W. Z., Omar A. R., Ho, Y. W. (2011).

Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. kernel meal extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 5955–5970.

Ovando-Medina I., Pérez-Díaz L. P., Ruiz-González S., Salvador-Figueroa M., Urbina-Reyes M. E., Adriano-Anaya L. (2016). Production of cytotoxic compounds in dedifferentiated cells of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *PeerJ*, 4, e2616.

Ovando-Medina I., Sánchez-Gutiérrez A., Adriano-Anaya L., Espinosa-García F., Núñez-Farfán J., Salvador-Figueroa M. (2011). Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the State of Chiapas, Mexico. *Diversity*, 3: 641-659.

Parida A. K., Das A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349.

Pastori G., Foyer C. H., Mullineaux P. (2000). Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 51: 107-113.

Pauwels L., Morreel K., De Witte E., Lammertyn F., Van Montagu M., Boerjan, W., Inzé D., Goossens A. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 1380-1385.

Pedranzani H., Racagni G., Alemano S., Miersch O., Ramírez I., Peña-Cortés H., Taleisnik E., Machado-Domenech E., Abdala G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41: 149-158.

Pedranzani H., Sierra-de-Grado R., Vigliocco A., Miersch O., Abdala G. (2007). Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulation*, 52: 111-116.

- Peer W. A., Brown D. E., Tague B. W., Muday G. K., Taiz L., Murphy A. S. (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 536-548.
- Pelletier M. K., Shirley B. W. (1996). Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings (Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase). *Plant Physiology*, 111: 339-345.
- Peterson G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356.
- Phillips D. R., Rasbery J. M., Bartel B., Matsuda S. P. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 305-314.
- Pompelli M., Barata-Luís R., Vitorino H., Gonçalves E., Rolim E., Santos M., Almeida-Cortez J., Endres L. (2010). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy* 34: 1207-1215.
- Posmyk M. M., Bailly C., Szafrńska K., Janas K. M., Corbineau F. (2005). Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 162: 403-412.
- Prasad D. M. R., Izam A., Khan M. M. R. (2012). *Jatropha curcas*: plant of medical benefits. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2691-2699.
- Prasad T. K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal*, 10: 1017-1026.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6: 65-74.

- Purkayastha J., Sugla T., Paul A., Solleti S. K., Mazumdar P., Basu A., Mohommad A., Ahmed Z., Sahoo L. (2010). Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum*, 54: 13-20.
- Rahnamale-Tajadod R., Loke K. K., Goh H. H., Noor N. M. (2017). Differential gene expression analysis in *Polygonum minus* leaf upon 24 h of methyl jasmonate elicitation. *Frontiers in Plant Science*, 8: 109.
- Ravindranath N., Ravinder R. M., Ramesh C., Ramu R., Prabhakar A., Jagadeesh B., Das B. (2004). New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 52: 608-611.
- Rejila S., Vijayakumar N., Jayakumar M. (2012). Chromatographic determination of allelochemicals (phenolic acids) in *Jatropha curcas* by HPTLC. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2: 123-128.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Rodríguez-Acosta M., Vega-Flores K., Gante-Cabrera V. H. D., Jiménez-Ramírez J. (2009). Distribución del género *Jatropha* L.(Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*, 28: 37-48.
- Ronchi A., Farina G., Gozzo F., Tonelli C. (1997). Effects of a triazolic fungicide on maize plant metabolism: modifications of transcript abundance in resistance-related pathways. *Plant Science*, 130: 51-62.
- Sabandar C. W., Ahmat N., Jaafar F. M., Sahidin I. (2013). Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha species* (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*, 85: 7-29.

- Salvador-Figueroa M., Magaña-Ramos J., Vázquez-Ovando J. A., Adriano-Anaya M. L., Ovando-Medina I. (2015). Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. *Plant Genetic Resources*, 13: 9-17.
- Samanta, A., Das G., Das S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmacy and Technology* 6: 12–35.
- Sánchez-Fernández R., Fricker M., Corben L. B., White N. S., Sheard N., Leaver C. J., Van Montagu M., Inzé D., May, M. J. (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 2745-2750.
- Sandorf, I., Holländer-Czytko H. (2002). Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216: 173-179.
- Sasaki-Sekimoto Y., Taki N., Obayashi T., Aono M., Matsumoto F., Sakurai N., Suzuki H., Hirai M. Y., Noji M., Saito K., Masuda, T., Takamiya K., Shibata D., Ohta H. (2005). Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44: 653-668.
- Saxena I., Srikanth S., Chen Z. (2016). Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7: 570.
- Schuppler U., He P. H., John P. C., Munns R. (1998). Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology*, 117: 667-678.
- Şener O., Can E., Arslan M., Çeliş N. (2008). Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of

spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22: 915-920.

Sgherri C. L., Navari-Izzo F. (1995). Sunflower seedling subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiology Plantarum*, 93: 25-30.

Shu X., Yin L., Zhang Q., Wang W. (2012) Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 893-902.

Shi J., Fu X. Z., Peng T., Huang X. S., Fan Q. J., Liu J. H. (2010). Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus *in vitro* plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology*, 30: 914-922.

Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1305-1319.

Shimizu T., Lin F., Hasegawa M., Okada K., Nojiri H., Yamane H. (2012). Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 19315-19325.

Shan X., Zhang Y., Peng W., Wang Z., Xie D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3849-3860.

Silva E. N., Ferreira-Silva S. L., Fontenele Ade. V., Ribeiro R. V., Viégas R. A., Silveira J. A. (2010). Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1157-1164.

- Silva E. N., Vieira S. A., Ribeiro R. V., Ponte L. F., Ferreira-Silva S. L., Silveira J. A. (2013). Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 159-169.
- Skoog F. Miller C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11:118-130.
- Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P. (2006). Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140: 637-646.
- Soomro R., Memon R. (2007) Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pakistan Journal of Botany*, 39: 2431-2441.
- Stefanowska M., Kuraś M., Kacperska A. (2002). Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) Leaves. *Annals of Botany*, 90: 637-645.
- Stracke R., Ishihara H., Huep G., Barsch A., Mehrrens F., Niehaus K., Weisshaar B. (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 50: 660-677.
- Subramanian S. S., Nagarajan S., Sulochana N. (1971). Flavonoids of some euphorbiaceous plants. *Phytochemistry*, 10: 2548-2549.
- Sujatha M., Dhingra M. (1993). Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35: 293-296.
- Sujatha M., Makkar H. P. S., Becker K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, 47: 83-90.

- Suzuki N., Mittler R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126: 45-51.
- Szliszka E., Czuba Z. P., Jernas K., Król W. (2008). Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 56-64.
- Talapatra S. K., Mandal K., Talapatra B. (1993). Jatrocurin, a new tetracyclic triterpene from *Jatropha curcas*. *Journal Indian Chemical Society*, 70: 543-548.
- Tattini M., Remorini D., Pinelli P., Agati G., Saracini E., Traversi M. L., Massai R. (2006). Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist*, 170: 779-794.
- Teng S., Keurentjes J., Bentsink L., Koornneef M., Smeekens S. (2005). Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology*, 139: 1840-1852.
- Theocharis A., Clément C., Barka E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235: 1091-1105.
- Thorpe G. W., Fong C. S., Alic N., Higgins V. J., Dawes I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:6564-6569.
- Toda K., Takahashi R., Iwashina T., Hajika M. (2011). Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene. *Journal of Plant Research*, 124: 173-182.

- Turan Ö., Ekmekçi Y. (2011). Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars exposed to chilling temperatures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 67-78.
- Valdés-Rodríguez O. A., Sánchez-Sánchez O., Pérez-Vázquez A. (2013). Effects of soil texture on germination and survival of non-toxic *Jatropha curcas* seeds. *Biomass and Bioenergy*, 48: 167-170.
- Velikova V., Yordanov I., Edreva A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- Vernoux T., Wilson R. C., Seeley K. A., Reichheld J. P., Muroy S., Brown S., Maughan S. C., Cobbett C. S., Montagu M. V., Inzé D., May M. J., Sung Z. R. (2000). The Root Meristemless1/Cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12: 97-109.
- Vivancos P. D., Dong Y., Ziegler K., Markovic J., Pallardó F. V., Pellny T. K., Verrier P.J., Foyer C. H. (2010). Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *The Plant Journal*, 64: 825-838.
- Wagner H., Bladt S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.
- Wang J., Tang F., Yue Y., Guo X., Yao X. (2010). Development and validation of an HPTLC method for simultaneous quantitation of isoorientin, isovitexin, orientin, and vitexin in bamboo-leaf flavonoids. *Journal of AOAC International*, 93: 1376-1383.

- Wang W. B., Kim Y. H., Lee H. S., Deng X. P., Kwak S. S. (2009). Differential antioxidation activities in two alfalfa cultivars under chilling stress. *Plant Biotechnology Reports*, 3: 301-307.
- Wang Z. Y., Chen F. L., Lin J. M., Huang S. L. (2009). Gas chromatography-mass spectrometric analysis of *Jatropha curcas* leaves extracts prepared by supercritical fluid CO₂ extraction. *Journal of Southern Medical University*, 29: 1002-1003.
- Wasternack C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100: 681-697.
- Wasternack C., Hause B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72: 165-221.
- Wasternack C., Hause B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111: 1021-1058.
- Wilkinson S., Kudoyarova G. R., Veselov D. S., Arkhipova T. N., Davies W. J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal Experimental Botany*, 63: 3499–3509.
- Williams R. J., Spencer J. P., Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 838-849.
- Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.
- Winkel-Shirley B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218-223.
- Winkel B. S. J. (2006). The biosynthesis of flavonoids. In: Grotewold E. (Ed) *The Science of flavonoids*. Springer, New York, pp. 71-95.

- Wolucka B. A., Goossens A., Inzé D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2527-2538.
- Yadav S. K., Dhote M., Kumar P., Sharma J. Chakrabarti T., Juwarkar A. A. (2010). Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *Journal of Hazardous Materials*, 180: 609-615.
- Yamasaki H., Uefuji H., Sakihama Y. (1996). Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Archives of Biochemistry Biophysic*, 332: 183-186.
- Yang H., Wu F., Cheng J. (2011). Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. *Food Chemistry*, 127: 1237-1242.
- Yin H., Chen Q., Yi M. (2008). Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regulation*, 54: 45-54.
- Zaragoza-Martínez F., Lucho-Constantino G. G., Ponce-Noyola T., Esparza-García F., Poggi-Varaldo H., Cerda-García-Rojas C. M., Trejo-Tapia G., Ramos-Valdivia A. C. (2016). Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127: 47-56.
- Zavala del Angel I., García-Pérez E., González-Hernández D., Pérez-Vázquez A., Ávila-Reséndiz C. (2016) Genetic diversity of *Jatropha curcas* L. in Veracruz state, Mexico, and its relationships with the content of phorbol esters, *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 5: 149-158.
- Zenk M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhang J., Jia W., Yang J., Ismail A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97: 111–119.

- Zhang L., Xing D. (2008). Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology*, 49: 1092-1111.
- Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D. W., Song C. P. (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 126: 1438-1448.
- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. (2005a). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.
- Zhao J., Fujita K., Sakai K. (2005b). Oxidative stress in plant cell culture: A role in production of β -thujaplicin by *Cupressus lusitanica* suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 90: 621-631.
- Zheng Y. L., Feng Y. L., Lei Y. B., Yang C. Y. (2009). Different photosynthetic responses to night chilling among twelve populations of *Jatropha curcas*. *Photosynthetica*, 47: 559-566.
- Zhu J. J., Li Y. R., Liao J. X. (2013). Involvement of anthocyanins in the resistance to chilling-induced oxidative stress in *Saccharum officinarum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 427-433.

9. Anexo 1

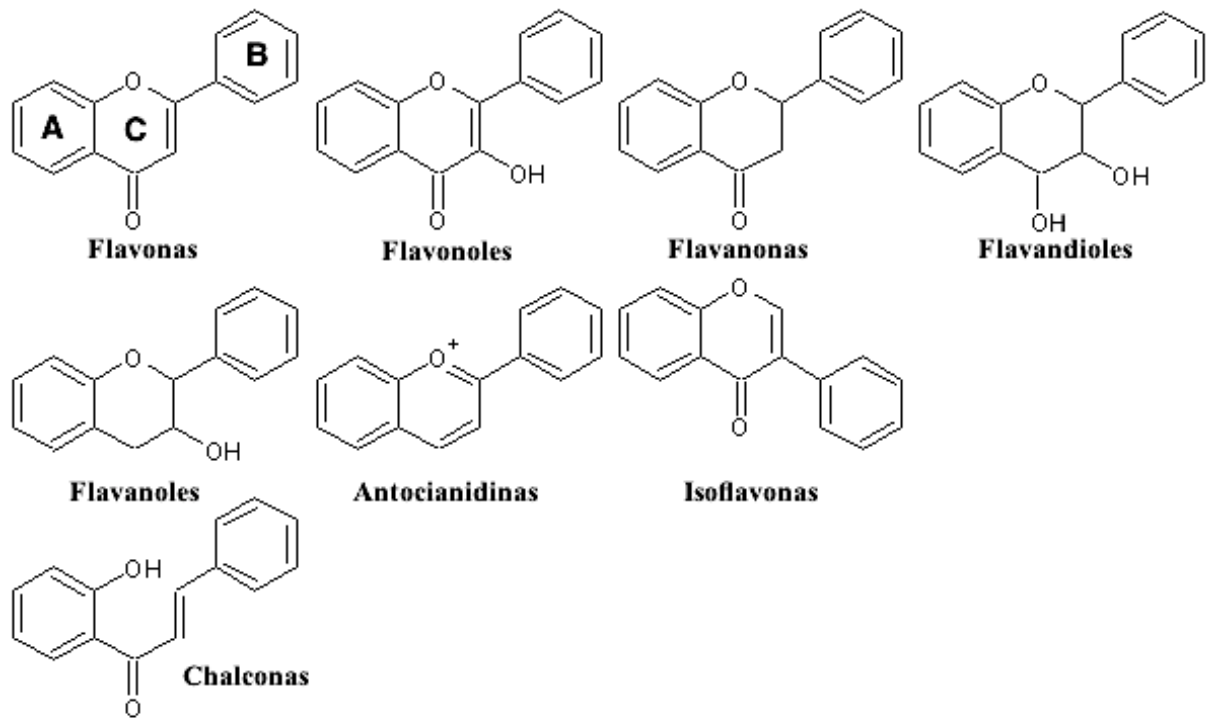


Figura 1. Clasificación de flavonoides en base a su estructura química según Winkel-Shirley (2001).

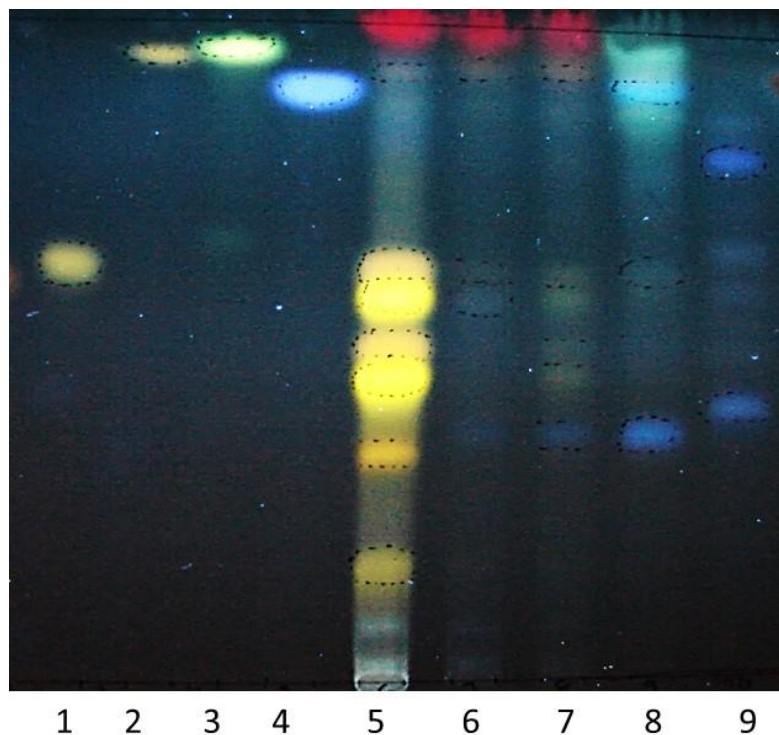


Figura 2. Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos metanólicos de diferentes tejidos de plantas de *J. curcas* de 75 d infestada por ácaros. Placa de sílica gel 60 F₂₅₄ desarrollada en fase móvil de tetrahidrofurano:tolueno:ácido fórmico:agua (16:8:2:1) y reveladas con PEG-3350 y DPBA. Carriles: (1) vitexina; (2) apigenina; (3) kaempferol; (4) ácido gálico; extracto de: (5) hoja; (6) peciolo; (7) tallo; (8) raíz y (9) látex.

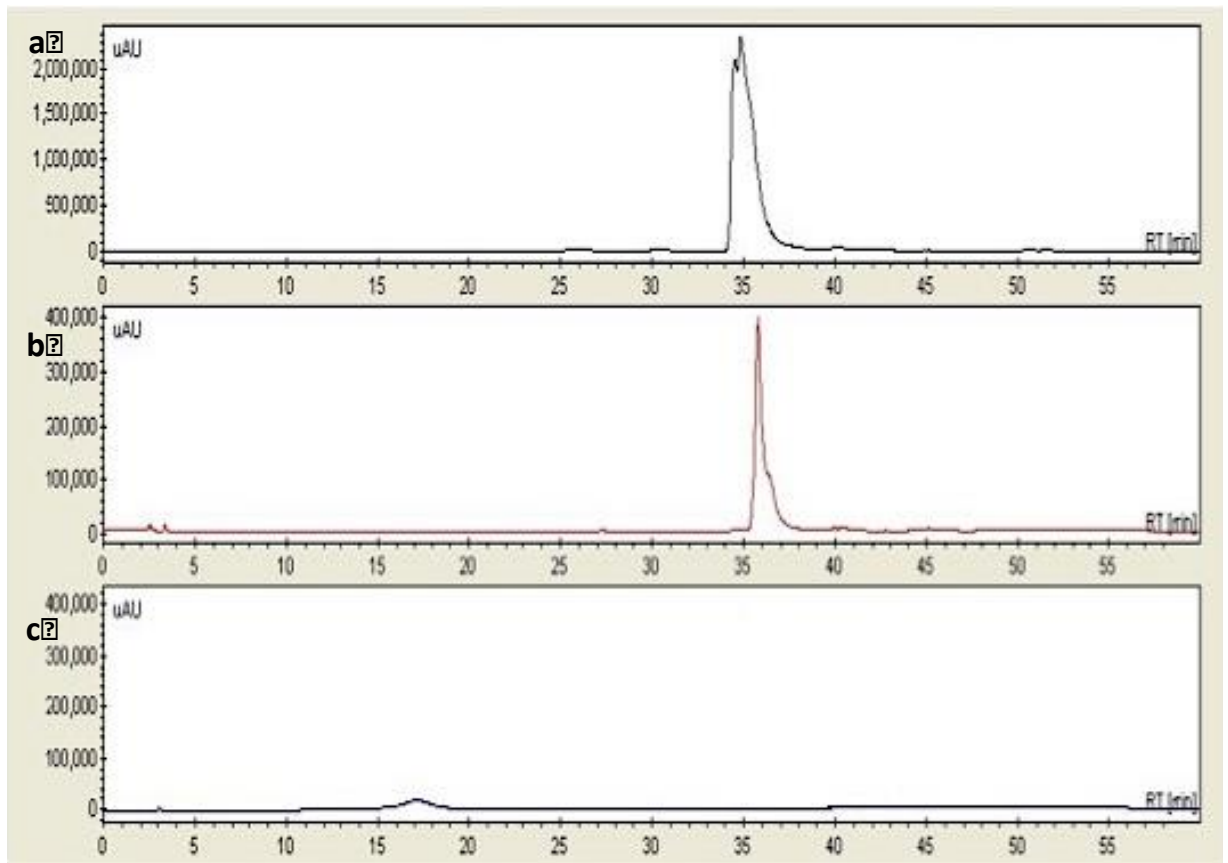


Figura 3. Cromatograma de estándares de flavonoides: a. Kaempferol. b. Apigenina. c. Vitexina obtenido por HPLC (detección a 333 nm) usando como fase móvil metanol y 0.1 % TFA en agua en un sistema por gradiente de acuerdo a Liu et al. (2010).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Gamborg's B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y del medio de cultivo Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962).

Compuesto	Gamborg's B5 mg/L	Murashige & Skoog mg/L
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	—	1650
NH ₄ SO ₄	134	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	332.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	370
KNO ₃	2500	1900
KH ₂ PO ₄	—	170
NaH ₂ PO ₄	130.5	—
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	3	6.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	16.9
KI	0.75	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	8.6
Orgánicos		
Mio-inositol	100	100
Glicina	—	2
Ácido nicotínico	1	0.5
Piridoxina-HCl	1	0.5
Tiamina	0.1	10

10. Anexo 2

Artículos publicados

Antioxidant responses under jasmonic acid elicitation comprise enhanced production of flavonoids and anthocyanins in *Jatropha curcas* leaves. **Lucho-Constantino G. G.**, Zaragoza-Martínez F., Ponce-Noyola T., Cerda-García-Rojas C. M., Trejo-Tapia G., Esparza-García F., Ramos-Valdivia A. C. (2017). *Acta Physiologiae Plantarum*.

Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. (2016). Zaragoza-Martínez F., **Lucho-Constantino G. G.**, Ponce-Noyola T., Esparza-García F., Poggi-Varaldo H., Cerda-García-Rojas C. M., Trejo-Tapia G., Ramos-Valdivia A. C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127: 47-56.