

Estudio del efecto de la relación carbono:nitrógeno, el tipo de inóculo y la adición de extracto de levadura en la producción de ácido jasmónico con *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1

Felipe Eng Sánchez¹, Mariano Gutiérrez-Rojas² y Ernesto Favela-Torres²

¹Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Ciudad de la Habana, Cuba;

²Universidad Autónoma Metropolitana, México DF, México

Resumen El ácido jasmónico es un regulador del crecimiento de las plantas producido por algas, microorganismos y plantas superiores, que participa en la activación de mecanismos de defensa contra patógenos y ante la presencia de heridas en las plantas. En este trabajo se estudió la influencia de la relación carbono:nitrógeno (rC/N: 17, 35 y 70), el tipo de inóculo (esporas o micelio) y la adición de extracto de levadura al medio de cultivo en la producción de ácido jasmónico por *Botryodiplodia theobromae*. Los estudios revelaron que la producción de ácido jasmónico es estimulada a una rC/N 17. La productividad del ácido jasmónico fue mayor para la inoculación con micelio y la adición de extracto de levadura al medio de cultivo en 1,7 y 1,3 veces, respectivamente.

Palabras clave Ácido jasmónico, *Botryodiplodia theobromae*, Fitohormona, Biosíntesis, Cultivo superficial

Studies on the effects of carbon:nitrogen ratio, inoculum type and yeast extract addition on jasmonic acid production by *Botryodiplodia theobromae* Pat. strain RC1

Summary Jasmonic acid is a native plant growth regulator produced by algae, microorganisms and higher plants. This regulator is involved in the activation of defence mechanisms against pathogens and wounding in plants. Studies concerning the effects of carbon: nitrogen ratio (C/Nr: 17, 35 and 70), type of inoculum (spores or mycelium) and the yeast extract addition in the media on jasmonic acid production by *Botryodiplodia theobromae* were evaluated. Jasmonic acid production was stimulated at the carbon: nitrogen ratio of 17. jasmonic acid productivity was higher in the media inoculated with mycelium and in the media with yeast extract 1,7 and 1,3 times, respectively.

Key words Jasmonic acid, *Botryodiplodia theobromae*, Phytohormone, Biosynthesis, Superficial culture

Dirección para correspondencia:

Dr. Felipe Eng Sánchez
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
Vía Blanca y Carretera Central 804, PO Box 4026
Ciudad de la Habana
Cuba
Tel.: +53 7 696 70 15
Fax: +53 7 698 82 43
E-mail: felipe.eng@icidca.edu.cu

Aceptado para publicación el 25 de enero de 2008

El ácido jasmónico y sus isómeros son un grupo de reguladores del crecimiento vegetal denominados *jasmوناتos*; estos compuestos son ciclopentanos derivados del ácido α -linolénico siendo sus representantes principales el isómero (+)-7-iso-ácido jasmónico y (-)-ácido jasmónico [5], y están distribuidos en algas [17], plantas superiores [5] y microorganismos [12]. Se conoce que a determinadas concentraciones pueden inhibir el crecimiento y la estimulación de la senescencia de las plantas, pero la función más documentada es la de favorecer la inducción de la expresión de genes de defensa por herida y el ataque de patógenos [16,18]. Recientemente, se ha podido apreciar que el ácido jasmónico y el metil jasmonato son capaces de inhibir el desarrollo de varias líneas de células cancerosas en animales y humanos [8].

En los hongos, el ácido jasmónico es un metabolito secundario sintetizado y secretado en la fase estacionaria de crecimiento después de 6-10 días de cultivo de *Botryodiplodia theobromae*, *Collybia confluens*, *Coprinus alkalinus* y *Mycena tintinabulum* [12] han sido descritos como productores de ácido jasmónico, pero sólo *B. theobromae* es capaz de producir ácido jasmónico en concentraciones del orden de los 500 a 1.500 mg/l en un medio de cultivo adecuado [6,7]. Sin embargo, el conocimiento sobre la producción de ácido jasmónico por los microorganismos es aún limitado, por lo que es necesario realizar estudios básicos sobre factores bioquímicos, fisiológicos y genéticos. Además de llegar así a la optimización del proceso, podría valorarse la producción de otros metabolitos de interés, como el ácido cucurbitico y el ácido (+)-9,10-dihidro-7-isojasmónico, también producidos por este hongo [13].

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de ciertos factores, como la relación carbono:nitrógeno (rC/N), el tipo de inóculo y la adición de extracto de levadura en la producción de biomasa y de ácido jasmónico en cultivo sumergido con *B. theobromae*.

Materiales y métodos

Microorganismo. *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1, procedente de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (Cuba) [6]. La cepa fue aislada de residuos de naranja (*Citrus sinensis* Osbeck cv Valencia) y sembrada en tubos inclinados con medio de extracto de malta agar (EMA, Merck), manteniéndola durante tres días a 30 °C. La cepa se conservó en tubos inclinados con medio EMA a una temperatura de 4 °C, resemebrándose cada cuatro semanas, y en las mismas condiciones, a lo largo de seis meses. Concluido este tiempo, se resemebró en residuos de naranja para regenerar sus propiedades de fitopatogenicidad y producción de ácido jasmónico.

Inóculo. Se obtuvo de cultivos superficiales en cajas Petri de 75 mm de diámetro, conteniendo medio EMA que fue inoculado por estría con micelio del hongo, y dejando incubar durante tres días a 30 °C. Diez trozos de micelio de 7 mm de diámetro o 4 ml de suspensión de las esporas ($2,58 \times 10^7$ esporas/ml, extraídas con una solución de Tween 80 (0,1%) en agitación con una barra magnética estéril) de *B. theobromae* se usaron para la inoculación de 50 ml de medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La incubación se llevó a cabo a 30 °C y sin agitación [6].

Medio de cultivo. La composición del medio de cultivo era la siguiente: sacarosa, 50 g/l; NaNO₃, 7,5 g/l; KH₂PO₄, 2 g/l; KCl, 0,3 g/l; MgSO₄·7H₂O, 0,6 g/l; FeSO₄·7H₂O, 0,6 g/l; ZnSO₄·7H₂O, 0,03 g/l; MnSO₄·7H₂O, 0,003 g/l; CuSO₄·7H₂O, 0,003 g/l; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,003 g/l [6]. Antes de la esterilización, el pH inicial se ajustó a 5,5-5,6

con NaOH (1 M). Para estudiar el efecto de la relación carbono:nitrógeno rC/N en el medio de cultivo se mantuvo la concentración de sacarosa constante a 50 g/l (donde la concentración inicial de carbono fue de 21 g/l) y sólo se varió la concentración de nitrógeno a 0,3; 0,765 y 1,23 g/l, lo que corresponde a una rC/N de 70, 35 y 17, respectivamente. Para el estudio del efecto de la adición del extracto de levadura en concentración 1 g/l al medio de cultivo, se calculó el aporte de nitrógeno del extracto y se completó la cantidad necesaria con NaNO₃ para mantener la concentración de nitrógeno en 1,23 g/l.

Métodos analíticos. La biomasa del hongo fue estimada a través de la determinación gravimétrica del peso seco. Los cultivos crecidos en los medios líquidos se filtraron en vacío con papel de filtro Whatman 41, se lavó el filtro con agua destilada y se secó a 105 °C hasta que el peso de la muestra se mantuvo constante. El medio filtrado se utilizó para la medición del ácido jasmónico producido por HPLC, según lo descrito por Koda [11], empleando un detector de UV (UV/Vis Spectrometric Detector LC 290, Perkin Elmer), metanol:ácido acético (60:0,1) como fase móvil, un flujo de trabajo de 0,85 ml/min y una columna de Spherisorb ODS-2. (\pm)-ácido jasmónico (Sigma) como estándar.

Análisis estadístico. Para el procesamiento de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. Se comprobó la normalidad de los datos por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza por la prueba de Barlett, cuando se analizaron más de dos grupos, o la prueba F cuando se analizaron dos grupos. Si cumplían las anteriores premisas, se empleó el análisis de la varianza de clasificación simple y la prueba de Rango Múltiple de Duncan [14]. El procesamiento estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Statgrafic Statistical Graphics System (versión 5.0). Se tuvieron en cuenta la concentración de biomasa al final del crecimiento rápido del microorganismo y la producción máxima de ácido jasmónico para los cálculos de todos los rendimientos. En las tablas se muestran los valores promedio de cinco réplicas \pm la desviación estándar. Los supraíndices en las tablas corresponden a los indicadores de significancia estadística según la prueba de Rango Múltiple de Duncan.

Resultados y discusión

Efecto de la relación carbono:nitrógeno. Se ha demostrado que la rC/N es uno de los factores que más afecta a la producción de metabolitos secundarios [15]. Por este motivo se ensayó el efecto de la rC/N, variando sólo la concentración de nitrógeno y manteniendo constante la concentración de carbono, en la producción de ácido jasmónico con *B. theobromae*.

El crecimiento del hongo presentó una fase de latencia de aproximadamente dos días. El crecimiento rápido para la rC/N 17 duró hasta los doce días, alcanzándose una concentración de biomasa de $10,05 \pm 0,40$ g/l, a partir de la cual comenzó la fase estacionaria. Sin embargo, para las rC/N de 35 y 70, el crecimiento rápido duró hasta los catorce días, aproximadamente, alcanzándose valores de biomasa de $8,25 \pm 0,38$ y $8,00 \pm 0,39$ g/l, respectivamente, sin diferencias significativas. Como la producción de biomasa del hongo fue diferente en las variantes en estudio se expresó la concentración de ácido jasmónico en términos de producción específica (mg ácido jasmónico/g de biomasa). Las productividades para las variantes estudiadas se muestran en la tabla 1; puede apreciarse que la producción específica máxima de ácido

Tabla 1. Efecto de la relación carbono:nitrógeno (rC/N) sobre la producción máxima específica y productividad del ácido jasmónico en el cultivo de *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1.

rC/N	Producción específica máxima (mgAJ/g biomasa)	Productividad (mgAJ/l.día)
17	109,3 ± 3,3 ^a	26,1 ± 0,78 ^a
35	73,7 ± 2,2 ^b	18,0 ± 0,54 ^b
70	53,5 ± 1,6 ^c	19,5 ± 0,59 ^b

Letras iguales en una misma columna: no existe diferencia estadística significativa según la prueba de Duncan ($p < 0,05$). AJ: ácido jasmónico.

jasmónico a la rC/N de 17 fue 1,5 y 2 veces superior a la producción específica máxima a valores rC/N de 35 y 70, respectivamente. Del mismo modo, la productividad a la rC/N de 17 fue aproximadamente de 1,4 veces superior a la productividad de las variantes con rC/N de 35 y 70. Günther y col. [10] señalaron que en la producción de ácido jasmónico con *B. theobromae* D7/2 puede emplearse en el medio una concentración de nitrato de potasio como fuente de nitrógeno entre 2 y 5 g/l, mientras que la concentración de la fuente de sacarosa fue de 50 g/l, lo cual significa que estos autores utilizaron una rC/N entre 75,87 y 30,34 [15]. Sin embargo, estudios realizados por Almeida y col. [1] con valores rC/Ns de 6 a 111, revelaron que la producción de ácido jasmónico de la cepa 715 de *B. theobromae* se estimuló preferentemente a un rC/N de 111 con una productividad de 85 mg/l día, utilizando una concentración de 90 g/l de sacarosa y 2,45 g/l de KNO₃ (37,5 g/l de carbono y 0,24 g/l de nitrógeno). Por otro lado, Farbood y col. [7] informaron que es posible la producción de ácido jasmónico por *Diplodia gossypina* (cepa ATCC 10936) en matraces Erlenmeyer con un medio limitado de nitrógeno y una rC/N de 150 (productividad de 170 mg ácido jasmónico/l día). Sin embargo, en condiciones similares pero a una rC/N de 75, estos autores encontraron que *D. gossypina* (cepa ATCC 20575) produjo ácido jasmónico en concentración de 1.263 mg/l, con una productividad de 140 mg/l día [7]. Estos resultados y los obtenidos en este trabajo con respecto a los descritos por Almeida y col. [1] evidenciaron que, dependiendo de la cepa utilizada, el efecto de la rC/N puede variar la producción de ácido jasmónico con estos hongos, debido posiblemente a que determinados valores de rC/N favorecen más la ruta metabólica de producción de este metabolito, siendo la rC/N óptima, diferente para cada cepa. Por lo tanto, es recomendable ensayar el uso de concentraciones variables de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo de *B. theobromae* Pat. cepa RC1 con vistas a optimizar la producción de ácido jasmónico con esta cepa. Además, es necesario iniciar el estudio de los genes y los enzimas involucrados en este tipo de ruta metabólica en hongos, incluyendo la expresión de los genes, y la regulación enzimática, entre otros, aspectos que hasta el momento son poco conocidos.

Efecto del tipo del inóculo. Para estudiar si el tipo de inóculo provoca algún efecto en el crecimiento y producción de ácido jasmónico con *B. theobromae*, se utilizó

micelio y esporas. Cuando se empleó la inoculación con micelio la ideofase se alcanzó aproximadamente a los 12 días del cultivo, mientras que para la variante inoculada con esporas la ideofase se alcanzó a los 14 días del crecimiento. El crecimiento máximo alcanzado por el microorganismo al final del experimento para la variante inoculada con micelio fue de 9,80 ± 0,40 g/l, sin diferencias significativas con la variante inoculada con esporas donde se alcanzó una concentración de biomasa de 9,13 ± 0,37 g/l.

La producción de ácido jasmónico en la variante inoculada con micelio se inició en la fase tardía del crecimiento, el octavo día de fermentación, obteniéndose una concentración máxima de 499 ± 15 mg/l de ácido jasmónico a los 11 días de cultivo. Después de este tiempo la biosíntesis de este compuesto disminuyó coincidiendo con el comienzo de la lisis celular. Por otro lado, en la variante inoculada con esporas, la producción máxima de ácido jasmónico se alcanzó a los 19 días, con una concentración de 490 ± 15 mg/l de ácido jasmónico; de forma similar, después de este tiempo, la concentración de ácido jasmónico disminuyó. En la tabla 2, se presentan los rendimientos de la producción de biomasa (Yx/s), ácido jasmónico (Yp/s) y la velocidad máxima de crecimiento (μ) y la productividad en la síntesis de ácido jasmónico en las dos variantes de estudio. Como se aprecia, no existen diferencias significativas en los rendimientos Yx/s y Yp/s para la inoculación con micelio o esporas, lo cual significa que la eficiencia para la utilización de la sacarosa para la formación de biomasa y la producción de ácido jasmónico fue muy similar en las variantes ensayadas. Sin embargo, la velocidad máxima de crecimiento y la productividad para la síntesis de ácido jasmónico se incrementaron en 1,4 y 1,7 veces, respectivamente cuando se utilizó micelio con respecto a las esporas del hongo. Este comportamiento pudiera explicarse en base a que el tiempo de producción máxima de ácido jasmónico empleando la inoculación con micelio se redujo a unos ocho días con respecto a la variante inoculada con esporas, por lo que la fase estacionaria de crecimiento en la variante con micelio se alcanzó más rápidamente, y es precisamente en esta fase donde se acumula el ácido jasmónico. Otros autores han sugerido para la producción de este metabolito la inoculación con micelio del hongo homogenizado en agua destilada estéril [12] o, más recientemente, la inoculación del micelio troceado con ayuda de un mezclador estéril [7]. Un comportamiento similar al obtenido en este trabajo fue descrito por Barrios y col. [2]. Estos autores encontraron que la inoculación con micelio incrementó la producción de penicilina de *Penicillium chrysogenum* con respecto a la producción del control inoculado con esporas del hongo, reduciéndose el tiempo de producción del antibiótico hasta un 30%. Además, la mayor producción no se debió a una mayor concentración de biomasa del hongo.

Efecto de la adición del extracto de levadura al medio de cultivo. Se conoce que en la síntesis del ácido α -linolénico (intermediario reconocido de la síntesis del ácido jasmónico en plantas) es necesaria la presencia de vitaminas [3].

Tabla 2. Rendimientos de la formación de biomasa (Yx/s) y ácido jasmónico (Yp/s) con respecto al consumo de sacarosa (sac), velocidad máxima de crecimiento (μ) y productividad del ácido jasmónico en los cultivos sumergidos de *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1 inoculados con micelio o esporas

Tipo de inóculo	Yx/s (g biomasa/g sac)	μ (día ⁻¹)	Yp/s (g AJ/g sac)x10 ⁻³	Productividad (mgAJ/l.día)
Micelio	0,196 ± 0,007 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	9,98 ± 0,30 ^a	45,45 ± 1,36 ^a
Esporas	0,183 ± 0,007 ^a	0,18 ± 0,01 ^b	9,88 ± 0,30 ^a	26,31 ± 0,79 ^b

Letras iguales en una misma columna: no existe diferencia estadística significativa según la prueba de Duncan ($p < 0,05$). AJ: ácido jasmónico.

Tabla 3. Rendimientos de la formación de biomasa (Yx/s) y ácido jasmónico (Yp/s) con respecto al consumo de sacarosa (sac), velocidad máxima de crecimiento (μ) y productividad del ácido jasmónico en los cultivos sumergidos de *Botryodiplodia theobromae* Pat. cepa RC1 con nitrato de sodio o nitrato de sodio más extracto de levadura (EL).

Fuente de nitrógeno	Yx/s (g biomasa/g sac)	μ (día ⁻¹)	Yp/s (g AJ/g sac)x10 ⁻³	Productividad (mgAJ/l.día)
NaNO ₃	0,183 ± 0,007 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	1,00 ± 0,03 ^a	41,6 ± 1,25 ^b
NaNO ₃ + EL	0,181 ± 0,007 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	1,11 ± 0,03 ^a	55,5 ± 1,67 ^a

Letras iguales en una misma columna: no existe diferencia estadística significativa según la prueba de Duncan ($p < 0,05$).
AJ: ácido jasmónico.

El extracto de levadura es un medio rico que contiene, entre sus componentes principales, un 7-9,5% de nitrógeno orgánico, cofactores, vitaminas y minerales. Granjer y col. [9] utilizaron, para el estudio sobre la limitación de los nutrientes del medio en la producción del ácido α -linolénico con *Rhodotorula glutinis*, 1 g/l de extracto de levadura en el medio de cultivo. Basándonos en estos antecedentes, se estudió el efecto de la adición del extracto de levadura al medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de ácido jasmónico por *B. theobromae*.

La adición de extracto de levadura no provocó un aumento de la concentración de biomasa, pero se alcanzó la fase estacionaria más rápidamente con respecto al medio sin extracto de levadura. Para la variante con extracto de levadura la ideofase se alcanzó a los cinco días de cultivo, continuando hasta el día 9, mientras que la ideofase para el control se alcanzó aproximadamente el día 9 de cultivo y su duración fue menor, pues a partir de ese momento el crecimiento disminuyó.

Para la variante con extracto de levadura se obtuvo una producción máxima de 550 mg/l de ácido jasmónico a los nueve días de cultivo, mientras que para la variante control la producción máxima se alcanzó a los once días de cultivo y alcanzó una concentración de 500 mg/l. En la tabla 3, se presentan los rendimientos de la producción de biomasa Yx/s y ácido jasmónico (Yp/s), la velocidad máxima de crecimiento y la productividad para la producción de ácido jasmónico para las variantes en estudio. Como se aprecia, los valores de Yx/s e Yp/s no presentan diferencias estadísticas significativas, lo que implica que la eficiencia para la producción de biomasa y ácido jasmónico fue similar en ambas variantes. Sin embargo, la velocidad máxima de crecimiento y la productividad en la variante con extracto de levadura con respecto al control se incrementaron en 1,7 y 1,3 veces, respectivamente. Este comportamiento podría explicarse en base a que la adición de extracto de levadura provocó un efecto positivo al propiciar un adelanto del inicio de la síntesis del ácido jasmónico, disminuyendo el tiempo al cual se alcanza la producción máxima de ácido jasmónico (dos días menos) con respecto al control. Esta mejora repercute en que se alcance más rápidamente la fase estacionaria, en la que se acumula el ácido jasmónico. Sin embargo, la producción del metabolito no se incrementó apreciablemente en comparación con el medio sin el extracto de levadura. Una explicación a este comportamiento está en el hecho de que la adición de extracto de levadura permite a la célula tomar del medio vitaminas y cofactores que favorecen el crecimiento de *B. theobromae*, alcanzando más rápidamente la fase estacionaria para sintetizar el ácido jasmónico. La variante control mostró que *B. theobromae* posee la capacidad de sintetizar este metabolito sin la presencia de estos compuestos, pero necesita de un tiempo mayor para alcanzar el mismo título.

Broadbent y col. [4] utilizaron extracto de levadura en uno de los primeros estudios acerca de la producción de ácido jasmónico por *Lasiodiplodia theobromae*. Más recientemente, Farbood y col. [7], además del extracto de levadura, utilizaron peptona de soya en el medio de cultivo de cepas de *D. gossypina* para la producción de ácido jasmónico. Sin embargo, no es recomendable el empleo de fuentes orgánicas complejas como única fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de *B. theobromae* al producirse ácido jasmónico en presencia de otras sustancias con malos olores, difíciles de separar, que harían inaceptable el empleo del ácido jasmónico en perfumería [10].

Conclusiones

La rC/N del medio de cultivo influye significativamente en la producción de ácido jasmónico con *B. theobromae*, que se ve favorecida a un valor rC/N de 17 respecto a rC/N 35 y 70. No obstante, se necesita optimizar este factor, pues el estudio sólo se realizó variando la concentración de nitrógeno en la rC/N. La inoculación con micelio de *B. theobromae* cepa RC1 para la producción de ácido jasmónico aumenta la productividad de éste en 1,7 veces con respecto a la inoculación con esporas, mientras que la adición de extracto de levadura (1 g/l) al medio de cultivo provoca un aumento de la productividad en 1,3 veces respecto a un medio de cultivo sin él.

El empleo de este medio de cultivo sencillo y relativamente barato, sin inductores externos, podría optimizarse y llevarse a niveles industriales para la producción de ácido jasmónico por parte de *B. theobromae*.

Este trabajo fue financiado en parte por un proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México).

Bibliografía

1. Almeida G, Michelena G, Altuna B, Legrá S, Armenteros S. Efecto de la relación C/N en la producción de AJ por *B. theobromae*. Revista sobre los derivados de la caña de azúcar 2001; 35: 100-105.
2. Barrios J, Castillo T, Domínguez M, Durán O, Flores V, Miranda L, Méndez S, Pérez C, Mejía A. Producción de penicilina por fermentación sólida: estudios básicos y desarrollo de proceso. VII Jornada de Biotecnología, Resúmenes *in extenso*, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, 1993.
3. Boulton C, Ratledge C. Microbial Lipids. In: Comprehensive Biotechnology: the Principles, Application & Regulations of Biotechnology Industry, Agriculture and Medicine. Vol 1. Oxford, Moo-Young, M. Pergamon Press Ltd. 1985; 459-482.
4. Broadbent D, Hemming HG, Turner WB. Preparation of jasmonic acid. GB Patent 1286266. Imperial Chemical Industries, Great Britain, 1968.
5. Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; 48: 355-381.
6. Eng F, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. *Process Biochem* 1998; 33: 715-720.
7. Farbood MI, Blocker RW, McLean, LB, Sprecker MA, McLean, MP, Kossiakoff N, Kim AY, Hagedorn M. Bioprocess for the high-yield production of food flavor-acceptable jasmonic acid and methyl jasmonate. United State Patent 6333180, International Flavor & Fragrances Inc, New York, 2001.
8. Flescher E. Jasmonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 2007; 245: 1-10.
9. Granger LM, Perlot P, Goma G, Pareilleux A. Effect of various nutrients limitations of fatty acids production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993; 38: 784-789.
10. Günther T, Miersch O, Fritsche W, Sembdner G. Synthetic media for manufacture of 7-isojasmonic acid with *Botryodiplodia theobromae*. DD 279688 A1. Academic of Sciences, German Democratic Republic. *Chemical Abstracts*. 1990; 114: 120297w.
11. Koda Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *Int Rev Citol* 1992, 135: 155-159.
12. Miersch O, Günther T, Fritsche W, Sembdner G. Jasmonates from different fungal species. *Nat Prod Lett* 1993; 2: 293-299.
13. Miersch O, Schneider G, Sembdner G. Hydroxylated jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 1991; 30: 4049-4051.
14. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. México DF, Grupo Editorial Iberoamericana, SA de CV de México DF, 1991.
15. Rose A. Production and industrial importance of secondary products of metabolism. *Economic Microbiology. Secondary Products of Metabolism*. Burlington, Academic Press, 1979.
16. Stout MJ, Thaler JS, Thomma B. Plant mediated-interaction between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Ann Rev Entomol* 2006; 51: 663-689.
17. Ueda J, Miyamoto K, Aoki M, Hirata T, Sato TJ, Momotani Y. Identification of jasmonic acid in *Chlorella* and *Spirulina*. *Bull University Osaka Pref* 1991; 43: 103-108.
18. Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O. The wound responses in tomato-Role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* 2006, 163: 297-306.