



Algunas consideraciones acerca de la utilización de fuentes carbonadas en la producción de ácido jasmónico

Giselle Almeida González, Miriam Klibansky Delgado, Beatriz Altuna Seijas, Felipe Eng Sánchez, Silvano Legrá Mora y Silvia Armenteros Galarraga

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Se evaluaron medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono como sacarosa, fructosa, glucosa y miel final clarificada para la producción de ácido jasmónico, a partir de una cepa de *Botryodiplodia theobromae*.

Los mejores resultados en la producción de ácido jasmónico se obtuvieron en un medio simplificado, compuesto por miel final, nitrato de potasio y dihidrógeno fosfato de potasio, sin necesidad de la adición de otras sales como Fe, Zn, Cu, Mo, etc. Esta alternativa garantizó un 100% de incremento en la producción de ácido jasmónico con relación al medio patrón, al obtenerse concentraciones de 2,08 g/l.

Ácido Jasmónico, Carbono, Miel final, *Botryodiplodia theobromae*, Fermentación microbiana

Some considerations about the use of carbon sources in jasmonic acid production

Summary

The effect of different carbon sources as sucrose, fructose, glucose and molasses were studied in relation to jasmonic acid production. The best results were obtained with a simple medium made up by final molasses, potassium nitrate and acid potassium phosphate, without the addition of other salts like Fe, Zn, Cu, Mo, etc. This alternative guaranteed a 100% increase in jasmonic acid production, compared to pattern medium, since a concentration of 2.08 g/l was obtained.

Key words

Jasmonic acid, Carbon, Final molasses, *Botryodiplodia theobromae*, Microbial fermentation

El ácido jasmónico (AJ) y sus compuestos derivados constituyen un grupo de sustancias endógenas, identificadas en una gran variedad de especies vegetales [1]. Fue aislado en 1971 a partir de sobrenadantes de cultivos del hongo *Lasiodiplodia theobromae* e identificado como potente inhibidor del crecimiento y senescencia de las plantas [2].

A partir de la década de los ochenta, se pudo demostrar otros efectos tales como: incremento de rendimientos agrícolas en fresa, soja y caña de azúcar; estimulación de la formación de tubérculos en *Discorea* spp [3], *Helianthus tuberosus* [4] y papa [5], maduración de frutos en tomates y manzanas [6], y un especial papel en los mecanismos de defensa de las plantas [7]. Se conoce que la activación de genes en las plantas por el ataque de patógenos o por heridas mecánicas provoca la síntesis de sustancias de defensa como el inhibidor de proteasas en las zonas dañadas [8,9]. La aplicación del AJ en plantas de tomate y tubérculos de papa ha provocado la acumulación del inhibidor de proteasas [10]. Los jasmonatos también pueden jugar un papel directo en la defensa de las plantas, se ha demostrado que la aplicación de AJ en plantas de arroz inhibe la germinación de esporas de *Pyricularia oryzae*, hongo que provoca la enfermedad conocida como tizón del arroz [11].

El uso de microorganismos para la producción de AJ demostró ser promisorio. Varias son las especies que se reportan como productoras de este compuesto, las más representativas son las cepas de *Botryodiplodia theobromae* y *Gibberella fujikuroi* [12].

Dirección para correspondencia:

Lic. Giselle Almeida González
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Vía Blanca #804,
San Miguel del Padrón, Apdo. Postal 4026,
Ciudad de la Habana, CP 11000, Cuba
Fax: +537 338 236; E-mail: icidca@ceniai.inf.cu

Aceptado para publicación el 15 de marzo de 1999

Los estudios realizados en cultivo líquido revelaron que *B. theobromae*, hongo fitopatígeno de zonas tropicales y subtropicales que causa la putrefacción de frutos y plantas [13], es capaz de producir este tipo de sustancia como resultado de su metabolismo secundario con rendimientos satisfactorios [14].

En este trabajo se empleó la miel final de caña como sustrato para la producción de AJ, ésta es el subproducto de la fabricación del azúcar crudo. Dicha miel es un líquido denso y viscoso que se separa de la masa final cocida, de baja calidad, y del cual no se puede cristalizar más azúcar por los métodos de extracción convencionales. La importancia de este subproducto como materia prima para la industria fermentativa es el aporte en carbono y la energía metabolizable que oscila alrededor de 2200 Kcal/Kg, además representa una fuente de gran valor para complementar la composición de los medios de cultivo por su contenido de aminoácidos, nucleótidos y vitaminas [15].

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio del efecto de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo para la producción de ácido jasmónico, evaluándose como alternativa la miel final de caña de azúcar cuya composición permite sustituir nutrientes carbonados y nitrogenados empleados en la producción de ácido jasmónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. Se utilizó la cepa 715 de *B. theobromae* obtenida de la colección de microorganismos del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT), La Habana, Cuba, la cual fue conservada en tubos inclinados con extracto de malta-agar (Merck) a 4°C.

cuatro réplicas por cada medio de cultivo. Los frascos se incubaron a 30°C en oscuridad, cultivo estático, durante 12 días. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la cuantificación de AJ.

Determinación de AJ. El medio de fermentación se separó del micelio por filtración al vacío, utilizando papel de filtro Whatman N° 4. Alícuotas de 5 ml del cultivo filtrado se ajustaron a pH 3 con HCl (4M) y se sometieron a extracción con acetato de etilo (1:1). Las fracciones conteniendo el AJ se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro y se llevaron a sequedad por rotoevaporación a 50°C.

Para la detección y cuantificación del AJ se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa [1].

Análisis Estadístico. Se realizó un análisis de varianza unifactorial para un nivel de confianza del 95%, empleando el paquete de programa estadístico Statgraphics Statistical Graphics System versión 5.0, 1985-1991, con el objetivo de determinar las diferencias significativas entre los valores promedios de concentración de AJ obtenidos en los medios de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios de producción de AJ se realizaron con la cepa 12 de *B. theobromae*, en base a que fue la cepa con mayor capacidad para producir AJ de las ensayadas. Se observó una ventaja a favor del medio E con miel final de caña clarificada como fuente de carbono y que sólo se suplementó con nitrato de potasio y fosfato de potasio monobásico, al obtenerse concentraciones de 2,08 g/l de ácido jasmónico, es decir, el doble de lo que se produjo con el medio patrón P (1,02 g/l) en el mismo tiempo de fermentación, a pesar de que en éste último se emplearon diferentes sales de hierro, manganeso y molibdato, entre otros (Figura 1).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo (g/l) utilizados en los estudios de producción de ácido jasmónico.

Componentes	Medios de cultivo					
	P	A	B	C	D	E
Sacarosa	50					
Glucosa		52,6				
Fructosa			52,6			
Miel clarificada*				50	50	50
KNO ₃	3	3	3	3	3	3
KH ₂ PO ₄	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2		
KCl	0,1	0,1	0,1	0,1		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,01		0,01		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001	0,001	0,001	0,001		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,001	0,001	0,001		

*: Expresada como sustancias reductoras totales.
En todos los medios de cultivo se mantuvo la relación C/N del medio patrón "P" (RC/N=16,6)

Medios de cultivo. Se empleó el medio Miersch [16] como patrón y variantes utilizando diferentes fuentes de carbono según se presenta en la tabla 1. Se usó miel clarificada por el método ácido en caliente [17].

Inóculo y condiciones de fermentación. Se utilizaron placas Petri con 25 ml de extracto de malta-agar, las cuales, se inocularon por estría a partir de micelio de la cepa 715 de *B. theobromae* procedente de los tubos inclinados crecidos durante tres días, las placas Petri sembradas se incubaron por 5 días a 30°C. Los medios de cultivo se ajustaron a pH 5,5 con NaOH (1N) y se esterilizaron durante 15 min a 120°C. Se inocularon 10 fragmentos miceliales de 8 mm de Δ, obtenidas a partir de siembras realizadas en placas Petri, en matraces de 500 ml con 100 ml de medio patrón y las variantes, se realizaron

Se evidenció que la sacarosa (medio P) constituyó excelente fuente de carbono, obteniéndose resultados de AJ superiores a lo reportado por otros autores (700-800 mg/l) [18], que la glucosa (medio A) y fructosa (medio B) para la síntesis de AJ, donde las concentraciones no fueron superiores a 0,25 g/l.

El medio D con miel final de caña y molibdato de sodio, se obtuvo una producción de AJ de 0,22 g/l, por lo que se infiere que la presencia de este metal pesado forme complejos con la miel que pudieran inhibir el sistema enzimático del microorganismo afectando la producción del metabolito de interés.

El medio C con todas las sales del medio patrón influyó negativamente en la producción de AJ, lo cual pudiera deberse a un exceso de sales aportado por la miel

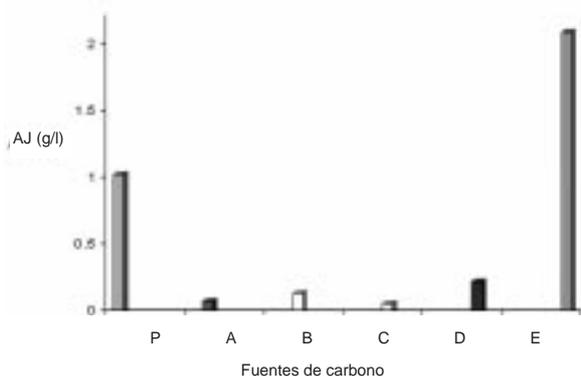


Figura 1. Efecto de las fuentes de carbono en la producción de ácido jasmonico. P: Patrón; A: Glucosa; B: Fructosa; C, D, E: Variantes con miel clarificada.

y el medio patrón, actuando como inhibidores en el proceso biológico.

El estudio estadístico mostró que el valor promedio de concentración de AJ obtenido por el medio de cultivo E presentó diferencias significativas con respecto al medio

patrón (P) y los restantes medios de cultivo. Los medios A, B, C y D no presentaron diferencias significativas entre ellos.

El resultado obtenido de la idoneidad de la miel final de caña (Medio E) está determinado por la riqueza de este sustrato desde el punto de vista fermentativo por su alto contenido de sales, azúcares y sustancias probióticas, especialmente sustancias complejas como aminoácidos, ácidos nucleicos, entre otros, que representan un ahorro biosintético de los microorganismos.

CONCLUSIONES

En el estudio realizado sobre diferentes fuentes de carbono en la producción de AJ, quedó demostrado que la miel final de caña constituye un excelente sustrato para la producción de este metabolito con producciones dos veces superiores en el mismo tiempo de fermentación a las obtenidas en el medio patrón reportado (Medio de cultivo P), es decir, concentraciones de 2,08 g/l en un término de 12 días, lo que permite incrementos de rendimiento y productividad del sistema.

Biibliografía

- Meyer A, Miersch O, Buttner C, Dathe W. **TITULO.** J Plant 1984; 3: 1-8.
- Aldridge D, Gatts S, Giles D, Turner W. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. J Chem Soc, Sec C 1971; 1623-1627.
- Koda Y, Kikuta Y. Possible involvement of Jasmonic Acid in tuberization of yam plants. Plant Cell Physiol. 1991; 32: 629-633.
- Koda Y, Takahashi K, Kikuta Y. Involvement of Jasmonic Acid and related compounds in the tuberization of Jerusalem Artichoke plants (*Helianthus tuberosus* L.). Jpn J Crop Sci 1994; 63: 333-338.
- Koda Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. Int Rev Citol 1992; 135: 155-199.
- Sembner G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Plant Physiol Plant Mol Biol 1993; 44: 569-589.
- Kitahara T, Warita Y, Abe M, Seya M, Takagi Y. Stereoselective synthesis of methyl epijasmonate. Agric Biol Chem. 1991; 55: 1013-1017.
- Cohen Y, Gisi U, Niderman T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. Phytopathology 1993; 83: 1054-1062.
- Xu D, McElroy D, Thornburg R, Wu R. Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding methyl jasmonate and abscisic acid in transgenic rice plants. Plant Mol Biol 1993; 22: 573-588.
- Yamagashi K, Mitsumori C, Takahashi K, Fujino K, Koda Y, Kikuta Y. Jasmonic acid inducible gene expression of a kunitz type proteinase inhibitor in potato tuber disk. Plant Mol Biol 1993; 21: 539-541.
- Hamberg M, Gardner H. Oxylipin pathway to jasmonates: Biochemistry and biological significance. Biochem Biophys Acta 1992; 1165: 1-18.
- Miersch O, Schmidt J, Sembdner G, Shreiber K. Jasmonic Acid like substances from culture filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 1989; 28: 1303-1305.
- Goos R, Cox E, Stotzky G. *Botryodiplodia theobromae* and its association with Musa species. Mycologia 1961; 53: 262-277.
- Miersch O, Gunther T, Fritsche W, Sembdner G. Jasmonates from different fungal species. Natural Product Letter 1993; 2: 293-299.
- Otero M.A, Reyes A, Saenz T. Mieles. En: Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. Colección GEPLACEA Serie Diversificación. Mexico, GEPLACEA/PNUD, 1988; 41.
- Broadbent D, Hemming H, Turner W. Preparation of Jasmonic Acid. GB Patent 1386266, C07C61/36. 1968.
- Almazán O, Klíbanky M, Otero M. Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera. La Habana, Ed Científico-Técnica, 1982; 23.
- Gunther T, Miersch O, Fritsche W, Sembdner G. Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-jasmonsäure. Patent DD. WP 279688 A1 C12P7/40. 1990.