

# PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA CON CEPAS DE *Botryodiplodia theobromae* NATIVAS DEL SURESTE MEXICANO

## JASMONIC ACID PRODUCTION VIA LIQUID FERMENTATION WITH *Botryodiplodia theobromae* STRAINS NATIVES TO SOUTHEAST MEXICO

Elan I. Laredo-Alcalá<sup>1</sup>, José L. Martínez-Hernández<sup>2</sup>, Lourdes Guillen-Cisneros<sup>3</sup>, Francisco D. Hernández-Castillo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923. 25315. Buena Vista, Coahuila, México. (elan\_laredo@hotmail.com) (fdanielhc@hotmail.com). <sup>2</sup>Cuerpo Académico de Nanobiociencia de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. 25280. Saltillo, Coahuila, México. (jose-martinez@uadec.edu.mx). <sup>3</sup>Centro de Investigación en Química Aplicada. Boulevard Enrique Reyna Hermosillo No.140. 25294. Saltillo, Coahuila, México. (lourdes.guillen@ciqa.edu.mx).

### RESUMEN

El ácido jasmónico (AJ) es una hormona endógena reguladora del crecimiento de plantas en las especies vegetales. Interviene en senescencia y resistencia y lo produce la planta después del daño ocasionado por microorganismos o insectos patógenos. Una alternativa para su producción es usar microorganismos y el más usado es *Botryodiplodia theobromae*. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de AJ mediante fermentación líquida con cepas de *B. theobromae*, aisladas de zonas tropicales del sureste de México. El diseño experimental fue completamente al azar y evaluamos la capacidad de producción de AJ de cada cepa. Los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para lo cual se usó el programa SAS. Un estudio cinético de producción se desarrolló con la cepa más productora de AJ mediante evaluación de pH, consumo de sustrato, biomasa y producción de AJ. Veinte cepas de *B. theobromae* se aislaron desde cacao, maracuyá, mango, coco y papaya en campos experimentales de los estados de Veracruz y Tabasco, México. Cinco de esas cepas produjeron AJ y el metabolito inicio su producción desde el día 10 de bioreacción. Así, se mostró que el hongo fitopatógeno de zonas tropicales *B. theobromae* puede producir AJ en un sistema de fermentación líquida.

### ABSTRACT

Jasmonic acid (JA) is an endogenous plant growth-regulating hormone found in plant species. It is involved in functions such as senescence and resistance. Plants produce these after damage due to pathogenic microorganisms or insects. An alternative for its production is to use microorganisms, the most used is *Botryodiplodia theobromae*. The objective of our study was to evaluate the JA production via liquid fermentation with *B. theobromae* strains, isolated from tropical areas of southeastern Mexico. The experimental design was completely random; the evaluated variable was the JA production capacity for each strain. The data were analyzed with the ANDEVA, and the means compared by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ), for which we used the SAS statistical software. Likewise, we developed a kinetic production study with the most JA producing strain through pH, substrate consumption, biomass, and JA production. Twenty *B. theobromae* strains were isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.), passion fruit (*Passiflora edulis* L.), mango (*Mangifera indica* L.), coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) in experimental fields at Veracruz and Tabasco, Mexico. Five of these strains produced JA. Metabolites started to be produced from day ten of the bioreaction. Thus, we show that the phytopathogenic fungus of tropic *B. theobromae* can produce JA in a liquid fermentation system.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2016. Aprobado: mayo, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 885-893. 2017.

**Keywords:** *Botryodiplodia theobromae*, bioproduction, jasmonates, secondary metabolites, phytohormone.

**Palabras clave:** *Botryodiplodia theobromae*, bioproducción, jasmonatos, metabolitos secundarios, fitohormona.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia natural de las plantas a patógenos se basa en efectos combinados de barreras preformadas y mecanismos inducibles, por lo cual las plantas utilizan protección física y bioquímica en contra de los invasores (Rangel *et al.*, 2010). Las hormonas vegetales son moléculas pequeñas de naturaleza química diversa, que controlan procesos como el crecimiento y desarrollo de la planta y su respuesta frente al estrés biótico y abiótico. El etileno, el ácido jasmónico (AJ) y el ácido salicílico son reguladores del crecimiento vegetal con función documentada en la respuesta de la planta (Lumba y Culter, 2010). El AJ es miembro de un grupo hormonal conocido como jasmonatos, de origen lipídico y lo genera la planta en respuesta al daño producido por microorganismos o insectos patógenos. El AJ actúa como molécula señal de las respuestas de las plantas a situaciones de estrés y participa en procesos del crecimiento y desarrollo (Avanci *et al.*, 2010; Pauwels y Goossens, 2011; Ting *et al.*, 2014). La aplicación exógena de este compuesto puede promover positivamente diversas funciones vegetales (Rohwer y Erwin, 2010). Hasta ahora se busca potencializar su uso en el campo, mediante tres alternativas de producción: síntesis química, extracción de tejidos vegetales y uso de metabolismo microbiano. De ellos, la síntesis química y la extracción de tejido vegetal presentan muy bajo rendimiento y costos altos (Dhandhukia y Thakkar, 2007). Una de las alternativas con resultados mejores es usar metabolismo microbiano en sistemas de fermentación. El hongo *Botryodiplodia theobromae* que ha mostrado los mejores rendimientos de producción de AJ (Aldridge *et al.*, 1971). *Botryodiplodia theobromae* es un hongo fitopatógeno en cultivos de zonas tropicales que causa pudriciones en frutos; en fruto de mango causa la pudrición del pedúnculo, lo cual genera pérdidas en la cosecha, dificulta el almacenamiento prolongado, reduce la calidad del fruto y dificulta su comercialización (Mirzaee *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2013). Pero, por su capacidad productora, el AJ es un microorganismo de interés científico porque el método de producción genera rendimientos satisfactorios y su impacto ecológico es bajo o casi nulo.

## INTRODUCTION

The natural resistance of plants to pathogens is the combined effects of preformed barriers and inducible mechanisms, whereby plants use physical and biochemical defenses against invaders (Rangel *et al.*, 2010). The plant hormones are small molecules of diverse chemical nature, which control processes such as growth and development of the plant and its response to the biotic and abiotic stress. Ethylene, jasmonic acid (JA) and salicylic acid are plant growth regulators with documented functions on the plant response (Lumba and Culter, 2010). JA, a member of a hormone group known as jasmonates, is of lipid origin and generated by plants in response to damage from pathogenic microorganisms or insects. JA acts as a signal molecule for plant responses to stress, and participates in the growth and development processes (Avanci *et al.*, 2010; Pauwels and Goossens, 2011; Ting *et al.*, 2014). The exogenous application of this compound can positively promote various plant functions (Rohwer and Erwin, 2010). It is until now that it's sought to boost its use in fields, and there are three production known alternatives: their chemical synthesis, extraction from plant tissues and microbial metabolism. From those, chemical synthesis and extraction from plant tissue shows high costs and very low yields (Dhandhukia and Thakkar, 2007). The alternatives with better results is the production via microbial metabolism on fermentation systems. The fungus *Botryodiplodia theobromae* has shown the best JA production yield (Aldridge *et al.*, 1971). *Botryodiplodia theobromae* is a phytopathogenic fungus in tropical crops that causes rotting in fruits; in mango fruit, it causes peduncle rotting, which generates post-harvest losses, makes it difficult to prolong their storage, reduces fruit quality and hampers its commercialization (Mirzaee *et al.*, 2002, Tovar *et al.*, 2013). However, due to its JA production capacity, it is of scientific interest, because the applied production method generates satisfactory yields and has low or almost no ecological impact.

The objective of this study was to show the JA production capacity of *B. theobromae* strains, isolated at Veracruz and Tabasco states, Mexico, and to evaluate the production kinetics of the highest

El objetivo de este estudio fue determinar la producción de AJ por cepas de *B. theobromae* aisladas en los estados de Veracruz y Tabasco, México, y evaluar la cinética de producción de la cepa con el rendimiento mayor. La hipótesis fue que al menos una de las cepas probadas produciría AJ en concentraciones similares o superiores a los 300 mg L<sup>-1</sup>, la cual es la concentración mínima óptima reportada en la literatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de tejido vegetal, aislamiento e identificación del microorganismo

El tejido vegetal recolectado fue de frutos, cortezas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), maracuyá (*Passiflora edulis* L.), papaya (*Carica papaya* L.), guaraná (*Paullinia cupana* L.) y cacao (*Theobroma cacao* L.). Estos tejidos se recolectaron en los campos experimentales Cotaxtla y Huimanguillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, en los estados de Veracruz y Tabasco. El campo Cotaxtla está ubicado en el kilómetro 34.5 carretera federal Veracruz-Córdoba, col. S/colonia, Medellín de Bravo, 94270. Veracruz; el campo experimental Huimanguillo se encuentra en el kilómetro 1 carretera Huimanguillo-Cárdenas, Huimanguillo, 86400. Tabasco. El aislamiento se realizó en el laboratorio de fitopatología del departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Para esta etapa se usaron los tejidos vegetales que presentaran síntomas de infección como picnidios y pudrición de color negra, los cuales se cortaron en trozos pequeños y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % en agua (v/v) por 2 min, se lavaron 1 min con agua destilada estéril por triplicado y se secaron sobre papel absorbente en una campana de flujo laminar. Cuatro trozos de tejido de cada muestra se colocaron sobre cajas Petri con medio PDA ubicados en puntos cardinales dentro de esta misma (Contreras, 2016). Las placas se incubaron 7 d a 28±1 °C, se realizó una resiembra por cultivo monospórico, y las cepas se identificaron mediante comparación morfológica macroscópica y microscópica con base en el color, la forma de la colonia, el crecimiento miceliar, esporulación y forma de conidios (Alves *et al.*, 2008).

### Producción de ácido jasmónico: fermentación líquida

Para la evaluación de producción de AJ por fermentación líquida se usó la metodología propuesta por Michelena (2001): en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio

yield strain. Our hypothesis was that at least one of the tested strains produce JA in concentrations equal or greater than 300 mg L<sup>-1</sup>, which is the optimal minimum concentration reported in the literature.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant tissue recollection, isolation and identification of the microorganism

The collected plant tissue came from fruits, bark and branches of mango (*Mangifera indica* L.), coconut (*Cocos nucifera* L.), passion fruit (*Passiflora edulis* L.), papaya (*Carica papaya* L.), guaraná (*Paullinia cupana* L.) and cocoa (*Theobroma cacao* L.). The samples were collected at the Cotaxtla and Huimanguillo experimental fields from the National Institute of Agricultural and Livestock Forestry Research (INIFAP) at the states of Veracruz and Tabasco, Mexico. The Cotaxtla field is located at 34.5 km of the federal Veracruz-Córdoba highway, Medellín de Bravo, Veracruz; the Huimanguillo experimental field is located at 1 km of Huimanguillo-Cárdenas road, Huimanguillo, Tabasco. The isolation was carried out at the phytopathology laboratory of the parasitology department of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. At this stage, we used plant tissues with infection symptoms such as pycnidia and black rot. These were cut into small pieces and disinfested with 1.5 % sodium hypochlorite in water (v:v) for 2 min. Then washed 1 min with sterile distilled water by triplicate, dried on absorbent paper in a laminar flow hood. Four tissue pieces from each sample were placed on Petri dishes with PDA medium (Contreras, 2016). The samples were placed located at cardinal points within the same dishes. The plates were incubated 7 d at 28±1 °C, re-sowing was performed by monosporic culture. The strains were identified by macroscopic and microscopic morphological comparison based on color, colony form, mycelial growth, sporulation and shape of conidia (Alves *et al.*, 2008).

### Jasmonic acid production: liquid fermentation

To assess the JA production by liquid fermentation we followed the methodology proposed by Michelena (2001). 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of modified Miersch medium were autoclaved for 15 min. To inoculate the medium, we placed three 5 mm diameter fragments from the precultured mycelium (obtained from plantings in Petri dishes) on PDA at 28 °C for 3 d. The flasks were then incubated 15 d in the dark at a constant 28 °C temperature without aeration or agitation.

Miersch modificado se esterilizaron 15 min en autoclave de presión, para inocular el medio se usaron tres fragmentos de 5 mm de diámetro del micelio pre cultivado (obtenidos de siembras realizadas en placas Petri) sobre PDA a 28 °C por 3 d. Después, los matraces se incubaron 15 d en oscuridad a una temperatura constante de 28 °C sin agitación ni aireación.

#### Medio de cultivo

La composición del medio Miersch modificado ( $\text{g L}^{-1}$ ) fue: sacarosa 50 g,  $\text{KNO}_3$  3 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g; KCl 0.1g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g;  $\text{MnSO}_4$  0.001g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001 g y extracto de levadura 0.1 g (Lorenzo *et al.*, 2007).

#### Determinación de ácido jasmónico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Al concluir la incubación, el caldo de la fermentación se separó del micelio por filtración al vacío, usando papel de filtro Whatman N° 4. Alícuotas de 5 mL del cultivo filtrado se ajustaron a pH 3.0 con HCl (4 M) y se realizaron tres extracciones con acetato de etilo (1:1) en un embudo de separación. Las fracciones con AJ se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro, se secaron por rotoevaporación a 50 °C (análisis por triplicado), se resuspendieron en 1 mL de acetato de etilo a un recipiente ámbar y se mantuvo en refrigeración a  $-4$  °C hasta su detección o cuantificación (Dathe *et al.*, 1981).

El AJ se determinó y cuantificó con la técnica descrita por Kramell (1999), con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Hewlett-Packard 1050, con un detector Ultravioleta HP79854A (Palo Alto, California, USA). El estándar fue AJ grado reactivo de la casa comercial SIGMA. La fase móvil estuvo compuesta de metanol-agua (60:40) con ácido acético al 1 % (V/V). El flujo fue  $0.85 \text{ mL min}^{-1}$  y con una columna Hypresil ODS (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$  d.i.). La detección se fijó a una longitud de onda de 295 nm.

#### Cinética de producción de ácido jasmónico y procedimientos analíticos

Una vez seleccionada la cepa con mejor rendimiento, se evaluó su capacidad de producción en relación al tiempo, con tres tiempos: 5, 10 y 15 d. Las condiciones de producción fueron las mismas que en la etapa anterior.

Al terminar la fermentación se realizó una filtración rápida, el sobrenadante se recuperó para análisis posteriores de consumo

#### Growing medium

The composition of the modified Miersch medium ( $\text{g L}^{-1}$ ) was: 50 g sucrose,  $\text{KNO}_3$  3 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g; KCl 0.1g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g;  $\text{MnSO}_4$  0.001g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001 g and 0.1 g yeast extract (Lorenzo *et al.*, 2007).

#### Jasmonic acid determination by HPLC

At the end of the incubation, we removed the fermentation broth from the mycelium by vacuum filtration using Whatman No. 4 filter paper. 5 mL aliquots of the filtered culture were adjusted to pH 3.0 with HCl (4 M), and from those, three extractions with ethyl acetate (1:1) in a separatory funnel were made. We then dehydrated the JA fractions with anhydrous sodium sulfate, dried by rotoevaporación at 50 °C (triplicate analysis), resuspended in 1 mL of ethyl acetate into amber flasks and kept them refrigerated at  $-4$  °C until its assessment (Dathe *et al.*, 1981).

For the JA determination and quantification, we followed the technique described by Kramell (1999) with a Hewlett-Packard 1050 high-performance liquid chromatography equipment, in which an HP79854A ultraviolet detector (Palo Alto, California, USA) was used. The control was JA laboratory grade from SIGMA commercial house. The mobile phase was composed of methanol-water (60:40) with 1 % acetic acid (v:v). The flow was of  $0.85 \text{ mL min}^{-1}$  with a Hypresil ODS column (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$  id). Detection was set at a 295 nm wavelength.

#### Kinetics of JA production and analytical procedures

Once the best yield strain was selected, its production capacity was evaluated about time, after 5, 10 and 15 d. Production conditions were the same as in the previous stage. At the end of the fermentation, a rapid filtration was performed and the supernatant recovered for subsequent substrate consumption analyzes (Dubois *et al.*, 1956), pH (Willard *et al.*, 1974), biomass (Arnáiz *et al.*, 2000) and JA. The experimental design was completely random, the assessed variable was JA production capacity for each strain, the data were analyzed with ANOVA, and the means were compared by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) for which the SAS 9.2 statistical software was used.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

The symptoms in the collected plant tissues were dark brown to black spots with small

de sustrato (Dubois *et al.*, 1956), pH (Willard *et al.*, 1974), biomasa (Arnáiz *et al.*, 2000) y ácido jasmónico.

El diseño experimental fue completamente al azar, la variable fue la capacidad de producción de AJ respecto a cada cepa, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para lo cual se usó SAS 9.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los síntomas en los tejidos vegetales recolectados fueron manchas oscuras de color café a negro con pequeños puntos negros superficiales y en algunas ocasiones pudriciones alrededor del pedúnculo, específicamente en maracuyá y mango. De los tejidos vegetales recolectados se obtuvieron 20 aislamientos fúngicos (Cuadro 1), que en medio de cultivo PDA mostraron: micelio de consistencia algodonosa de un color blanco los primeros 9 d de crecimiento, tornándose después el micelio color negro; además, éste formó picnidios agrupados o en racimos parcialmente sumergidos. El micelio fue septado, con conidios inmaduros no septados (amerospora) y conidios maduros septados (didimosporas) de unas medidas promedio en  $20 \times 15 \mu\text{m}$ , paredes membranosas, carnosas, globosas, con frecuencia papiladas. Esta descripción concuerda con lo descrito por otros autores (Pitt y Hocking, 2009; Picos-Muñoz *et al.*, 2015), quienes reportan las principales características de *B. theobromae* desarrollado en diversos medios de cultivo, y mencionan que la principal característica de identificación macroscópica es la formación de picnidios, mientras que microscópicamente su conidio es alargado con un septo al centro (Figura 1).

### Producción de ácido jasmónico por fermentación líquida

Al término del proceso de caracterización morfológica se evaluó la producción de AJ. Las muestras resultantes de la fermentación se prepararon y analizaron por cromatografía líquida de alta resolución. De los 20 aislamientos ocho produjeron AJ en un sistema de fermentación líquido. La producción de AJ varió de 6.5 a  $552 \text{ mg L}^{-1}$ , y el aislamiento con la clave 3B tuvo el rendimiento menor, mientras que el aislamiento 3C mostró la concentración mayor, con  $552 \text{ mg L}^{-1}$  (Cuadro 2). La capacidad de los microorganismos fúngicos para

superficial black spots and sometimes with rotten tissue around the peduncle, specifically on passion fruits and mangos. Twenty isolates obtained from the collected plant tissues (Table 1) showed in PDA culture medium: cottony consistency mycelium of white color during the first 9 d of growth, which later turned the mycelium to a black color; also, it formed grouped pycnidia or partially submerged clusters. The mycelium was septate, with non-septate immature conidia (amerospore) and mature septate conidia (didimospores) with an average length of  $20 \times 15 \mu\text{m}$ , membranous, fleshy, globose, often with papillary walls. This description complies to others described by several authors (Pitt and Hocking, 2009; Picos-Muñoz *et al.*, 2015), who report the main characteristics of *B. theobromae* developed in various culture media to be the pycnidia formation the main macroscopic identification characteristic, while microscopically its conidia is elongated with a septum at the center (Figure 1).

### Production of jasmonic acid by liquid fermentation

At the end of the morphological characterization process the JA production was evaluated. The resulting fermentation samples were prepared and HPLC analyzed. Among the 20 isolates eight showed JA produced in the liquid fermentation systems. The production of JA ranged from 6.5 to  $552 \text{ mg L}^{-1}$ . The 3B isolate had the lowest

**Cuadro 1. Asignación de clave de cepas obtenidas y fuente de origen vegetal.**

**Table 1. Key assignment of strains obtained and source of plant origin.**

Aislamiento (clave)	Tejido vegetal	Aislamiento (clave)	Tejido vegetal
1C	Mango	7 A	Cacao
1D	Mango	7B	Cacao
2A	Mango	8A	Cacao
2B	Mango	8B	Cacao
3A	Coco	9A	Cacao
3B	Coco	10A	Cacao
3C	Coco	11A	Cacao
4C	Maracuyá	11C	Cacao
5A	Guaraná	11D	Cacao
6B	Papaya	11E	Cacao



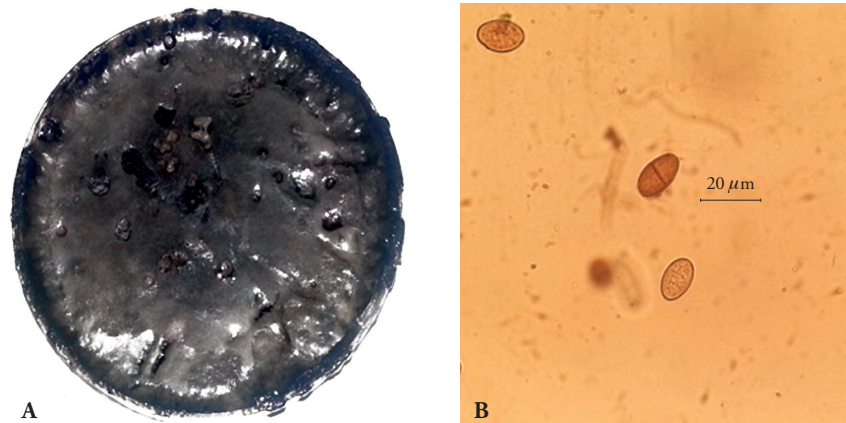


Figura 1. Características morfológicas de *Botryodiplodia theobromae*: A) Micelio cultivado en PDA con 21 d de incubación; B) conidio bicelular (didimospora) y conidio inmaduro (amerospora).

Figure 1. Morphological characteristics of *Botryodiplodia theobromae*: A) mycelium cultured in PDA with 21 d of incubation and B) bicellular conidium (didimospore) and immature conidium (amero-spore).

sintetizar AJ es variable entre cepas, incluso de la misma especie; así, hay cepas que producen AJ en concentraciones superiores a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que otras producen pocos  $\text{mg L}^{-1}$  (Farbood *et al.*, 2001). Además, *Gibberella fujikuroi* (Miersch *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (Cole *et al.*, 2014) y *Pseudomonas syringae* (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2016) producen AJ en pequeñas concentraciones. Pero desde el primer informe de la producción microbiana del AJ (Broadbent *et al.*, 1968) hasta ahora, se ha mostrado que *B. Theobromae* tiene mayor potencial para su producción.

La concentración de AJ producido fue similar y superior al promedio en otros experimentos, en los cuales se produjo AJ con el mismo sistema de fermentación líquida con medios de cultivo que contenían altas concentraciones de carbohidratos (Dhandhukia y Thakkar, 2007; Eng *et al.*, 2008).

El análisis estadístico mostró que las cepas 3C, 11E y 2A fueron diferentes ( $p \leq 0.05$ ) a las demás cepas y mostraron los rendimientos más altos de AJ. Por lo tanto, se usó la cepa 3C para los siguientes experimentos relacionados con la cinética de producción.

### Cinética de producción de ácido jasmónico

Las variables respecto al tiempo fueron el consumo de sustrato, el pH, la producción de biomasa

yield, while the 3C isolate showed the highest concentration,  $552 \text{ mg L}^{-1}$  (Table 2). The ability of fungal microorganisms to synthesize JA has high variability among strains, even from the same species; thus, there are strains that produce JA in concentrations higher than  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , while others produce few  $\text{mg L}^{-1}$  (Farbood *et al.*, 2001). In addition, *Gibberella fujikuroi* (Miersch *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (Cole *et al.*, 2014) and *Pseudomonas syringae* (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2016) produce JA in small concentrations. Still, since the first report of JA microbial production (Broadbent

Cuadro 2. Aislamientos con capacidad productora de ácido jasmónico.

Table 2. Isolates with jasmonic acid production capacity.

Aislamiento (Clave)	Ácido jasmónico ( $\text{mg L}^{-1}$ )
2A	$454.5 \pm 0.29^b$
3B	$6.5 \pm 0.28^g$
3C	$552 \pm 1.61^a$
3D	$42.8 \pm 1.158^e$
8A	$13.2 \pm 0.09^f$
11C	$30.1 \pm 1.97^d$
11D	$28.2 \pm 1.01^d$
11E	$444.5 \pm 2.487^c$

\* Valores con letra diferente son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). ❖ \* Values with different letters are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

y la producción de ácido jasmónico. Al término del día 5 el microorganismo consumió casi 60 % de los carbohidratos adicionados. El pH disminuyó de 7 a 4.1 en los primeros 5 d de fermentación de manera continua, y este cambio se pudo deber a la acumulación de los metabolitos resultantes del proceso de degradación de sustrato (Marero *et al.*, 1997). Los resultados del estudio de producción de biomasa mostraron una clásica curva de crecimiento microbiana: en los primeros 5 d de bioproceso se presentó la fase de crecimiento exponencial, y en el día 10 inició la fase estacionaria. En nuestro estudio no se apreció la etapa de muerte microbiana porque el experimento no alcanzó el tiempo necesario. Los resultados de la evaluación de AJ mostraron que desde el día 10 la producción de este metabolito comienza en 35.45±1.2 ppm, y después 5 d aumenta drásticamente hasta 564.99±2.1 ppm. El comportamiento observado en nuestro estudio fue similar al reportado por Pinakin (2007), quien realizó un estudio cinético de varias cepas de *B. theobromae* y obtuvo una producción de 50-100 mg L<sup>-1</sup>, lo cual muestra que este microorganismo puede producir AJ como metabolito secundario en un bioproceso de fermentación en estado líquido. Además, Castillo (2014) cuantificó e identificó diversas hormonas en un caldo fermentado de tres cepas de *B. theobromae* y los niveles de producción fueron cercanos a 100 ppm.

*et al.*, 1968), so far *B. theobromae* has shown that has a greater production potential.

The produced JA concentration was similar or above the average range in other experiments in which they produced JA using the same liquid fermentation system, in culture media containing high concentrations of carbohydrates (Dhandhukia and Thakkar, 2007; Eng *et al.*, 2008).

Statistical analysis showed that strains 3C, 11E and 2A were different ( $p \leq 0.05$ ) to the other strains and showed the highest JA yield. Therefore, we used strain 3C for the following experiments related to production kinetics.

### Jasmonic acid production kinetics

The variables concerning time were: substrate consumption, pH, biomass production and JA production. By the end of day five, the microorganism consumed about 60 % of the added carbohydrates. The pH continuously decreased from 7 to 4.1 the first 5 d of fermentation. This change was due to metabolites accumulation resulting from the substrate degradation process (Marero *et al.*, 1997). The results of the biomass production show a classical microbial growth curve: during the first 5 d of the bioprocess presented an exponential growth phase and from day ten on a stationary phase. In this study the microbial death stage was not assessed because the

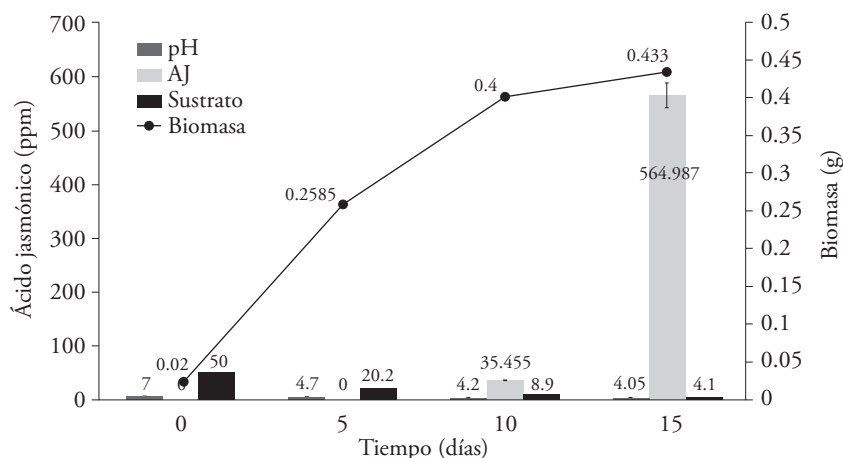


Figura. 2. Cinética de evaluación de producción de ácido jasmónico por fermentación líquida con las variables pH, consumo de sustrato, producción de biomasa y producción de ácido jasmónico en medio Miersch modificado.

Figure. 2. Kinetics of jasmonic acid production by liquid fermentation. Evaluated variables: pH, substrate consumption, biomass production and production of jasmonic acid in modified Miersch medium.

## CONCLUSIONES

En nuestro estudio se obtuvieron e identificaron morfológicamente aislamientos de *Botryodiplodia theobromae* nativos del sureste mexicano y se mostró que produjeron ácido jasmónico en un sistema de fermentación líquida con rendimientos satisfactorios. El estudio cinético de producción de ácido jasmónico mostró que los aislamientos inician su producción después de 10 d, lo cual demuestra que es un metabolito secundario y, además, que al menos cuatro aislamientos lograron superar la concentración mínima óptima reportada en la literatura.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Jesús Uresti, investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agropecuarias y Pecuarias (INIFAP) del Centro de Investigación Regional Golfo Centro, actualmente La Posta, estado de Veracruz, por la ayuda y atención brindada en la etapa de recolección de muestras.

## LITERATURA CITADA

- Aldridge D., S. Galt, D. Giles, and W. Turner. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. J. Chem. Soc. 2: 1623-1627.
- Alves A., P. Crous, A. Correia, and A. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 28: 1-13.
- Arnáiz C., L. Isac, y J. Lebrato. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Tecnol. Agua 205: 45-52.
- Avanci N., D. Luche, G. Goldman, and M. Goldman. 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. Genetic Mol. Res. 9: 484-505.
- Broadbent D., H. Hemming, and W. Turner. 1968. Preparation of Jasmonic Acid. GB Patent 1286266. Imperial Chemical Industries, Great Britain. pp: 1-3.
- Castillo G., A. Torrecillas, C. Nogueiras, G. Michelena, J. Sánchez, and M. Acosta. 2014. Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* by liquid chromatograph-electrospray tandem mass spectrometry. World J. Microbiol. Biotechnol. 30: 1937-1946.
- Cole S., A. Yoon, K. Faull, and A. Diener. 2014. Host perception of jasmonates promotes infection by *Fusarium oxysporum* formae speciales that produce isoleucine- and leucine-conjugated jasmonates. Mol. Plant Pathol. 15: 589-600.
- Contreras L., Y. S. 2016. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. Acta Agronómica 65: 51.
- Dathe W., H. Rönisch, A. Preiss, W. Schade, G. Sembdner, and K. Schreiber. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. Planta 153: 530-535.

experiment did not reach the necessary time for it. The results of the JA evaluation show that from day 10, metabolite production starts at  $35.45 \pm 1.2$  ppm, and 5 d later dramatically increases to  $564.99 \pm 2.1$  ppm. The observed behavior was similar to that reported by Pinakin (2007), who performed a kinetic study of several strains of *B. theobromae* and obtained a 50-100 mg L<sup>-1</sup> production. This shows that the microorganism can produce JA as a secondary metabolite in a liquid fermentation bioprocess. Also, Castillo (2014) quantified and identified various hormones in a fermented broth from three *B. theobromae* strains which production levels were close to 100 ppm.

## CONCLUSIONS

In our study we obtained isolates of *B. theobromae* strains native to southeastern Mexico and morphologically identified them; they produced jasmonic acid in a liquid fermentation system, with satisfactory yields. The JA kinetic production shows that the isolates begin production after 10 d, which shows that it is a secondary metabolite. In addition, at least four isolates managed to surpass the minimum optimal concentration reported in the literature.

—End of the English version—



- Dhandhukia P., and V. Thakkar. 2007. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. J. Appl. Microbiol. 105: 636-643.
- Dubois M., K. Giles, J. Hamilton, P. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chem. 28: 350-356.
- Eng F., M. Gutiérrez, y E. Favela. 2008. 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. Rev. Iberoam. Micol. 25: 188-192.
- Farbood M., R. Blocker, L. McLean, M. Sprecker, M. McLean, N. Kossiakov, A. Kim, and M. Hagedorn. 2001. Bioprocess for the high-yield production of food flavor-acceptable jasmonic acid and methyl jasmonate, United States Patent 6333180, International Flavors & Fragrances Inc. New York USA. pp: 1-34.
- Gimenez-Ibanez S., A. Chini, and R. Solano. 2016. How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers. Plants 5: 9.



- Kramell R., O. Miersch, G. Schneider, and C. Wasternack. 1999. Liquid chromatography of jasmonic acid amine conjugates. *Chromatographia* 49: 42-46.
- Lorenzo M., J. González., y G. Michelena. 2007. Métodos de metilación de jasmonatos y análisis por cromatografía gaseosa. *Rev. Inst. Cub Inv. Derivados de la Caña de Azúcar* 41: 39-43.
- Lumba S., and S. Cutler. 2010. Plant nuclear hormone receptors: a role for small molecules in protein-protein interactions. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 26: 445-469.
- Marero L., J. Jin, H. Shin, I. Lee, I. Chung, and J. Lee. 1997. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 97-101.
- Michelena G., E. Carrera, A. Bell, B. Altuna, y G. Almeida. 2001. Proceso de separación y decoloración del ácido jasmónico a partir de *Botryodiplodia theobromae* cepa 715. *Rev. Tecnol. Ciencia, Educación* 16: 12-19.
- Miersch O., T. Gunther, W. Fritsche., and G. Sembdner. 1993. Jasmonates from different fungal species. *Nat. Prod. Lett.* 2: 293-299.
- Mirzaee M., M. Azadvar, and D. Ershad. 2002. The incidence of *Lasiodiplodia theobromae* the cause of fruit and stem-end rot of mango in Iran. *Iran. J. Plant Pathol.* 38: 62-65.
- Pauwels L., and A. Goossens. 2011. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* 23: 3089-3100.
- Picos-Muñoz P. A., R. S. García-Estrada, J. León-Félix, A. Sañudo-Barajas, y R. Allende-Molar. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33: 54-74.
- Pinakin C., and R. Vasudev. 2007. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 707-712.
- Pitt J., and A. Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. Springer. pp: 125-127.
- Rangel G., E. Castro, E. Beltran, H. Reyes, y E. García. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12: 90-95.
- Rohwer C., y J. Erwin. 2010. Spider mites (*Tetranychus urticae*) perform poorly on and diverse from plants exposed to methyl jasmonate. *Entomol. Expert. Appl.* 1: 1-10.
- Ting L., M. Kun, M. Hong-Li, L. Yang, L. Ling, and H. Yang. 2014. Jasmonic acid enhancement of anthocyanin accumulation is dependent on phytochrome a signaling pathway under far-red light in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1: 78-83.
- Tovar M., J. Mora, C. Nava, D. Téliz, A. Villegas, and S. Leyva. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (jacq.) H. E. Moore and stearn] grafts in México. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 233-238.
- Willard H., L. Merrit, and J. Dean. 1974. *Instrumental Methods of Analysis*. Van Nostrand Reinhold Company; 5th edition. 879 p.