

# PROCEDIMIENTO TECNOLÓGICO PARA OBTENER UN BIOPRODUCTO DE ÁCIDO JASMÓNICO PARA USO AGRÍCOLA

**Autores principales:** Felipe Eng Sánchez y Georgina Michelena Álvarez

**Otros autores:** Grolamys Castillo Portela, Grisel Ortega Arias-Carbajal, Beatriz Altuna Seijas, Justo González-Olmedo, Silvano Legra, Magdalena Lorenzo Izquierdo, Silvia Matos, Silvia Armenteros, Ricardo Readigos, Miriam Klibansky, Xiomara Álvarez, Emilia Carrera, Antonio Bell, Evelyn Faife y Fidel Domenech

**Colaboradores:** Martha León, Miguel Angel Peña, Aidin Martínez, Carlos Santiesteban, Asela Reyes, Caridad Alonso, Mercedes Guerra, Addiss Bermello, Ingrid Rojas, Ramón Santos, María Emis Yanes, Raysa Gonzalez, Nieves Cruz, Rafael Castañeda, Odette Beiro, Yordanka Domínguez, José Trujillo, Onelio Carballo, Emilio Alvarez, Cristina Pérez, Caridad Noriega, Isora Franco Dominguez, Miguel Socorro Quesada, Dulce Maria Alasá

**Entidad Ejecutora Principal:** Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) perteneciente al Grupo Empresarial Azucarero (AZCUBA).

**Felipe Eng Sánchez** (12%). Ha participado en el desarrollo de los experimentos de selección de cepas productoras de AJ, en la identificación de una cepa *Lasiodiplodia* sp cepa 2334 por taxonomía polifásica, el estudio de la optimización del medio del cultivo, del efecto de la forma de inoculación, el efecto de la temperatura, la agitación, la relación carbono: nitrógeno, en el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo, en la caracterización de los metabolitos producidos por la cepa seleccionada que son excretados al medio de cultivo a partir de la utilización de la CG-EM y el empleo de sustratos para la detección de enzimas intracelulares y en el clonaje de genes involucrados en la síntesis de AJ de este hongo. Participó en los estudios de producción de AJ por fermentación en medio sólido. Sustituyó al Jefe del Proyecto en su ausencia. Además ha participado en el entrenamiento de varios investigadores y estudiante de grado y de maestría en las técnicas de cultivo del hongo para la producción de jasmonatos. Participó en la elaboración de informes de tareas de investigación vinculadas a los proyectos relacionados, así como en los informes finales de proyecto. Culminó con éxito su tesis de maestría y de doctorado en los temas relacionados con las temáticas de este trabajo.

**Georgina Michelena Álvarez** (12%). Ha participado en la coordinación, planificación de los experimentos y en el análisis de los resultados del proyecto. Ha participado en el desarrollo de los experimentos de selección de cepas productoras de AJ, el estudio de la optimización del medio del cultivo, del efecto de la forma de inoculación, el efecto de la temperatura, la agitación, la relación carbono: nitrógeno, en el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno del medio

de cultivo. Además ha participado en el entrenamiento de varios investigadores y estudiante de grado y de maestría en las técnicas de cultivo del hongo para la producción de jasmonatos. Ha realizado las actividades de coordinación con otras instituciones y participado en la introducción de los resultados. Ha dirigido el proyecto durante los últimos 10 años. Ha asesorado y tutorado tesis de maestrías y doctorados relacionadas con la temática. Participó en la elaboración del procedimiento normalizado del proceso de producción del producto BIOJAS y en el manual de procedimientos normalizados de la planta de fermentaciones del ICIDCA. Participó en la confección del expediente de seguridad biológica de la planta de fermentación. Elaboró el expediente de registro del producto BIOJAS para el Registro Central de Fertilizantes de Cuba. Participó en la elaboración de informes de tareas de investigación vinculadas a los proyectos relacionados, así como en los informes finales de proyecto.

**Beatriz Altuna Seijas** (10%). Ha participado en el desarrollo de los experimentos de selección de cepas productoras de AJ, el estudio de la optimización del medio del cultivo, del efecto de la forma de inoculación, el efecto de la temperatura, la agitación, la relación carbono: nitrógeno, en el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo. Sustituyó al Jefe del Proyecto en su ausencia. Además ha participado en el entrenamiento de varios investigadores y estudiante de grado y de maestría en las técnicas de cultivo del hongo para la producción de jasmonatos. Participó en la coordinación con otras Instituciones en las pruebas para la validación agronómica del BIOJAS®.

**Grolamys Castillo Portela** (10%). Ha participado en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación por HPLC de AJ y en el estudio de caracterización química de diversos metabolitos obtenidos en la producción microbiana de *Botryodiplodia theobromae*. Fue jefe de un proyecto de investigación MINAZ (2007-2009) titulado: "Identificación, caracterización y cuantificación de metabolitos bioactivos con actividad reguladora en plantas obtenidos en la producción microbiana". Además ha participado en el entrenamiento de varios investigadores y estudiantes de grado y de maestría en las técnicas analíticas para la determinación de AJ. Actualmente está realizando tu tesis de doctorado en la caracterización química de metabolitos de los caldos fermentados de *Botryodiplodia theobromae*.

**Grisel Ortega Arias-Carbajal** (10%). Ha participado en el proceso de preparación de muestras a partir de caldos de fermentación de ácido jasmónico obtenido por vía microbiana, empleando extracción líquido-líquido, para el montaje de los métodos analíticos de determinación del compuesto activo cualitativamente por cromatografía de placa delgada y cuantitativamente, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de Gases (CG). Participó en la separación y purificación del ácido jasmónico a partir de caldos de fermentación, mediante métodos extractivos y cromatógraficos. Participó en la caracterización del compuesto activo y de otros metabolitos, por métodos instrumentales, espectroscópicos UV e IR. Gestionó la documentación contractual con los

institutos que evaluaron la efectividad agronómica del producto BIOJAS. Participó en la elaboración del procedimiento normalizado del proceso de producción del producto BIOJAS y en el manual de procedimientos normalizados de la planta de fermentaciones del ICIDCA. Participó en la confección del expediente de seguridad biológica de la planta de fermentación. Elaboró el expediente de registro del producto BIOJAS para el Registro Central de Fertilizantes de Cuba. Participó en la elaboración de informes de tareas de investigación vinculadas a los proyectos relacionados, así como en los informes finales de proyecto.

**Justo González-Olmedo** (10%). Trabajó en el proyecto sobre jasmonatos coordinado por la dirección de Biotecnología del ICIDCA, evaluó los efectos del producto, generando las obras presentadas en Congresos en Cuba y en el extranjero, así como la formación de capital humano especializado que defendió exitosamente tesis vinculadas al tema a nivel de pregrado, Maestría y Doctorado.

**Silvano Legra** (8%). Participó en el mantenimiento de la cepas de *Botryodiplodia theobromae*, preparación de medios de cultivo, producción del ácido jasmónico a diferentes escalas, envasado y etiquetado del producto, Además participó en las aplicaciones del producto en campo.

**Emilia Carreras** (4%). Trabajó en la purificación del ácido jasmónico a partir de caldos fermentados, empleando diferentes métodos extracción con solventes, adsorción sobre carbón activado, granular y en polvo, intercambio iónico. Participó en los estudios de inhibición del crecimiento de *Leuconostoc sp* con AJ, como un agente de biocontrol a nivel de laboratorio e industrial dando lugar a la formulación del producto EVIPOL. Participó en la realización de experiencias de aplicación de este producto Participó en pruebas a nivel industrial en los ingenios España Republicana y Héctor Molina, aplicando un formulado del ácido jasmónico que sirvió de base para una patente del producto y una marca registrada. Participó en los estudios de estabilidad de AJ.

**Magdalena Lorenzo** (4%). Participó de los procesos de aislamiento, la identificación y cuantificación del ácido jasmónico para su caracterización, obtenido de caldos de fermentación a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae*. Desarrolló métodos de cromatografía en capa fina, HPLC, gases, extractos del caldo fermentado se analizaron por espectroscopia IR, los resultados encontrados permitieron la cuantificación del producto para su registro como biofertilizante así como constituyen una herramienta para el control de la concentración del producto en los caldos de fermentación para su posterior aplicación en la agricultura y dieron lugar al tema de una tesis de maestría. Además ha participado en el entrenamiento de varios investigadores y técnicos.

**Silvia Matos** (4%). Participó en el mantenimiento de la cepas de *Botryodiplodia theobromae*, preparación de medios de cultivo, producción del ácido jasmónico a diferentes escalas.

**Silvia Armenteros** (4%). Participó en la preparación de muestras para las determinaciones analíticas por métodos cromatográficos (placa, HPLC, gases, columna). Realiza la filtración, rotoevaporación de las muestras y las determinaciones analíticas de caracterización del producto. Trabajó además en la purificación del compuesto activo por columna de adsorción.

**Ricardo Readigos** (4%). Ha participado en el desarrollo y validación del método analítico para la determinación de AJ por HPLC. Ha realizado los análisis de diversas muestras, para todos los estudios de optimización del procedimiento tecnológico y del registro del producto. Ha participado en adiestramiento realizado en esta determinación.

**Xiomara Álvarez** (2%). Trabajó en la purificación y mantenimiento de la cepa de *Botryodiplodia* así como otros trabajos de microbiología.

**Antonio Bell** (2%). Participación en los proyectos relacionados con la temática, en la planificación, diseño y análisis de los resultados obtenidos para la separación de un pigmento en caldos conteniendo ácido jasmónico, obtenido por vía microbiana, mediante el uso de distintos ácidos y extracción con solventes orgánicos. Participó en pruebas a nivel industrial en los centrales cubanos España Republicana y Héctor Molina, aplicando un formulado del ácido jasmónico que sirvió de base para una patente del producto y una marca registrada. Se realizó además un estudio de inhibición del crecimiento de la bacteria *Leuconostoc sp* y los experimentos a nivel industrial dando lugar a la formulación del producto EVIPOL.

**Evelyn Faife** (1%). Participó en la elaboración del procedimiento normalizado del proceso de producción del producto BIOJAS y en el manual de procedimientos normalizados de la planta de fermentaciones del ICIDCA. Participó en la confección del expediente de seguridad biológica de la planta de fermentación; lográndose el permiso de seguridad biológica otorgado por el Centro Nacional de Seguridad Biológica.

**Fidel Domenech López** (1%). Participó en el registro del producto BIOJAS, gestionando los documentos contractuales sobre aplicación del producto. Participó en la presentación y defensa del registro en la comisión de expertos del Registro Central de Fertilizantes, cuyo registro se otorgó, y en la elaboración del procedimiento biotecnológico de producción del BIOJAS<sup>®</sup>.

## RESUMEN

### Antecedentes

El ácido jasmónico (AJ) es un regulador del crecimiento vegetal endógeno del tipo de las abscinas, sintetizado de manera natural por una gran variedad de plantas. Se ha demostrado su efecto en la agricultura para el incremento de rendimientos, estimulación de la formación de tubérculos y la maduración de frutos. También promueve la senescencia de las hojas y se le atribuye un papel regulador en la respuesta de defensa de las plantas. La producción comercial del AJ a nivel mundial se realiza a partir de la extracción y purificación de flores de jazmín y té.

### Problemas a resolver y objetivo del trabajo

Los productos obtenidos a partir de extractos de plantas con las tecnologías existentes presentan muy bajas concentraciones de AJ y altos costos de producción. Con vista a resolver esta problemática, se realizó este trabajo encaminado al desarrollo y la aplicación de caldos libres de células ricos en AJ obtenido por vía microbiana, empleando el hongo *Botryodiplodia theobromae*, siendo, estos estudios los primeros desarrollados por vía microbiana, lo que constituye la novedad del mismo. El objetivo de este trabajo fue: “obtener un procedimiento biotecnológico viable técnico y económico de un bioproducto de ácido jasmónico para su empleo en la agricultura”.

### Resultados

Como resultados novedosos y de impacto científico se reconocen el establecimiento de un proceso de fermentación con altas concentraciones de AJ hasta  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$ , el establecimiento de una técnica de cromatografía HPLC para la determinación de AJ, la confirmación mediante espectrometría CG-EM por primera vez en hongos de la presencia de metabolitos intermediarios como el OPDA, 11-OH-AJ, 9,10 dihidro AJ y OPC-4 de la ruta metabólica del AJ en plantas y la presencia de ácido cucúrbico. Mediante el procedimiento tecnológico se obtuvo un bioproducto (BIOJAS<sup>®</sup>) rico en AJ, el cual se evaluó en diferentes cultivos, como: caña de azúcar, vitropíntulas de piña, en plátano, fresa, toronja, papa y arroz, con resultados satisfactorios de incrementos en los rendimientos, desarrollo de raíces, efectos favorables en respuesta al estrés biótico y abiótico, sin provocar daños ambientales. Las pruebas toxicológicas, ecotoxicológicas del BIOJAS<sup>®</sup> obtenido, evidenciaron su no toxicidad. El procedimiento que se propone para la producción de 3000 L/a de BIOJAS<sup>®</sup> (suficientes para la satisfacción de la demanda nacional) es altamente rentable, con una ganancia de 400 000 Pesos/a y 27 000 USD/a.

Se realizaron un doctorado, dos tesis de maestría y seis tesis de grado, con resultados satisfactorios. Se obtuvieron las marcas: BIOJAS<sup>®</sup> (Producto líquido rico en AJ) y EVIPOL (biocida sal de AJ), una patente de invención de EVIPOL en la Oficina Cubana de Propiedad Industrial y el registro del BIOJAS<sup>®</sup> en el Registro Central de Fertilizantes de Cuba. Se realizaron 39 publicaciones en revistas

nacionales y extranjeras de prestigio, destacándose seis de estas en revistas con índice de impacto, 58 presentaciones en eventos científicos nacionales e internacionales; se otorgaron seis premios ICIDCA, tres premios MINAZ, dos premios del Forum municipal y dos premios del Forum Provincial de Ciencia y Técnica.

El conjunto de estos trabajos constituye un aporte al conocimiento científico al haberse diseñado un proceso tecnológico reproducible y de escala semicomercial de producción de BIOJAS® para su uso como bioestimulador y biocontrolador. Estos estudios han permitido que el país cuente con un producto de factura nacional y medio de fermentación económico imprescindible en el control biológico para cultivos de interés económico.

### **Conclusiones**

Se logró el desarrollo de un procedimiento biotecnológico para la producción de AJ viable técnico y económicamente y consecuente con el medio ambiente. Se obtuvo un producto comercial denominado BIOJAS®, rico en esta sustancia, que mostró efectividad agronómica en las pruebas desarrolladas como bioestimulante y controlador biológico, sin mostrar afectaciones tóxicas y ecotoxicológicas.

## **COMUNICACIÓN CORTA**

### **Antecedentes**

La contaminación de los suelos y las aguas por el uso incorrecto de plaguicidas y abonos minerales, la agricultura intensiva que empleada indiscriminadamente dificulta el desarrollo natural de los ciclos biogeoquímicos y la migración de nutrientes, son factores que han conllevado a la erosión progresiva de los suelos y a la disminución de su productividad. En estas circunstancias ha resultado necesaria la creación de nuevos principios en cuanto al uso del suelo como recurso renovable: la agricultura sostenible (Anónimo, 2010).

La introducción de productos resultados del desarrollo de la Biotecnología en la agricultura permite la obtención de mayores rendimientos de las cosechas, desarrollar cultivos más productivos e incrementar la calidad de los mismos, siendo todo esto de vital importancia para los países en vías de desarrollo (Castillo y col., 2007).

En los últimos años se ha incrementado en Cuba el desarrollo del uso de medios biológicos para su aplicación en la agricultura, fortaleciéndose la producción de biofertilizantes, biopesticidas y otros productos que constituyen una industria incipiente y productiva.

El empleo de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) es una de las alternativas compatibles con los principios de la agricultura sostenible, debido a que son menos agresivos para el medio ambiente que los plaguicidas y fertilizantes

minerales convencionales (Nieto y Frankenberger, 1990).

Los jasmonatos conforman un grupo numeroso de compuestos RCV, precursores o derivados del ácido jasmónico (AJ) que se presentan fundamentalmente en el reino vegetal y además en algunas bacterias, hongos y levaduras (Abdala y col., 1999; Forchetti y col., 2007). La aplicación exógena de los jasmonatos ejerce varios efectos, como son: la inducción de la síntesis de proteínas, la síntesis de sustancias de defensa (Stout y col., 2006), (Wasternack, 2006), la estimulación de la formación de tubérculos (Koda, 1992; Cenzano y col., 2003), la maduración de frutos (Sanz y col., 1993), la inhibición del crecimiento y la estimulación de la senescencia, entre otras. De ahí la importancia que tiene el empleo del AJ para mejorar los rendimientos agrícolas, al permitir la reducción del uso de plaguicidas por la activación de los sistemas defensivos de las plantas (Vivanco y col., 2005).

La producción comercial del AJ se realiza de forma intensiva a partir de la extracción de flores de jazmín y té, donde se encuentra en concentraciones de trazas que dificultan y encarecen el proceso productivo (Dhanhukia y Thakkaar, 2007a), por lo que este producto se coloca en el mercado mundial a elevado costo, los precios oscilan entre 300-400 USD/g calidad reactivo.

En la actualidad las investigaciones se enfocan desde varios aspectos tales como: la búsqueda de cepas de hongos productoras de AJ capaces de crecer en medios de cultivos simples, los estudios de la fisiología y de las condiciones del cultivo que favorecen la producción del AJ, la ruta metabólica para su síntesis y aplicación de los caldos de AJ en el desarrollo de procedimientos para el fomento de la agricultura sostenible (Farbood y col., 2001; Inho y col., 2006; Dhanhukia y Thakkaar, 2007a,b,c,; Linares y col., 2010, Tsukuda y col., 2011).

Desde el año 1996 el ICIDCA trabaja en varios proyectos nacionales vinculados al programa bioagrícola, en donde se han desarrollado tecnologías de producción de biocontroladores por vía microbiológica en especial el AJ. La propuesta tecnológica de producción de BIOJAS<sup>®</sup> está acorde con la Política para la producción y desarrollo de los biofertilizantes y bioplaguicidas de Cuba, en la que se insta a utilizar bioproductos de producción nacional para la fertilización de los suelos, la estimulación del desarrollo vegetal y la protección fitosanitaria, para sustituir la importación de fertilizantes y plaguicidas químicos, en lo cual el país gasta millones de MLC anualmente.

### **Problema a resolver y objetivos**

Con vista a resolver la problemática expuesta se realizaron los estudios encaminados al desarrollo de un procedimiento biotecnológico para la producción eficiente y escalable del AJ, bioestimulante y controlador biológico obtenido a partir de la producción por vía fermentativa con una cepa autóctona del hongo ascomiceto *Botryodiplodia theobromae*, producto de elevado costo en el mercado mundial. El objetivo de este trabajo fue “obtener un procedimiento biotecnológico

viable técnico y económico de un bioproducto de AJ para su empleo en la agricultura”.

## Resultados

Como resultados novedosos y de impacto científico se reconoce el establecimiento del proceso de fermentación con altas concentraciones de AJ hasta  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$ , superior a lo informado por otros autores (Farbood y col., 2001). Se logró la cuantificación del AJ por Cromatografía Gaseosa (CG) y por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los caldos fermentados. Los métodos analíticos fueron validados de acuerdo a las normas establecidas. Esto permitió constar con métodos analíticos validados para el seguimiento de todos los estudios de optimización del procedimiento tecnológico de la producción de AJ y el registro del producto. El ICIDCA es actualmente la única Institución cubana que dispone de estos métodos fiables para este tipo de determinación.

La confirmación por primera vez, mediante espectrometría CG-EM, de la presencia en hongos de metabolitos intermediarios como el OPDA; 11-OH-AJ; 9,10-dihidroAJ y OPC-4 de la ruta metabólica del AJ en plantas y la presencia del ácido cucúrbico en concentración de trazas. De forma similar se detectó que el hongo es capaz de sintetizar oxipilinas como el ácido 9-hidroxi-10-ceto-12,15-octadecadienoico, ácido 10-hidroxihexadecatrienoico y ácido 11-hidroxihexadecatrienoico, a semejanza con lo descrito para plantas.

Al optimizar las condiciones y medio de cultivo se pudo apreciar que el proceso se favorece inoculando con micelio del hongo, a 30-32 °C, en estático; en ausencia de luz, en medio con glucosa,  $\text{NaNO}_3$ , otras sales y extractos de malta y levadura y a una relación carbono: nitrógeno (rC/N) de 15. A pesar de que el incremento de la escala de trabajo disminuyó la concentración de AJ, se obtuvieron caldos libres de las células que permitieron la realización de las pruebas biológicas para su validación agronómica.

Como resultado de estos estudios científicos se logró establecer la producción semicomercial, en la planta de fermentaciones del ICIDCA, del BIOJAS<sup>®</sup>, un caldo del sobrenadante del cultivo del hongo libre de células del hongo rico en AJ para su uso en la agricultura como regulador del crecimiento y controlador de plagas. En el trabajo se presenta un procedimiento tecnológico de producción, que incluye los procedimientos normalizados de operación (PNO) de la planta de fermentaciones existentes en el ICIDCA, contemplándose además, las etapas de control de calidad realizadas en los laboratorios de Microbiología, analítica y productos terminados y en los almacenes, facilidades auxiliares centrales y otras instancias. Las consideraciones económicas de aplicación del producto indicaron que el balance costo-beneficio es altamente beneficioso, pues indica un costo de producción de pesos y pesos en divisas contra 300-400 USD/g que se oferta por mercados extranjeros. La factibilidad productiva en las instalaciones del ICIDCA se calcula para la demanda anual, con una producción de 3000 L/a (junto a otros bioagrícolas), en 400 000 pesos moneda total.



Entre los impactos económicos, sociales y medioambientales se destacan:

- Disponer de un nuevo bioproducto agrícola cubano, registrado y con una adecuada imagen comercial, imprescindible en el control biológico para cultivos de interés económico.
- Disminución de los gastos del Estado en MLC, por sustitución efectiva de importaciones de fertilizantes y plaguicidas químicos.
- Ingresos en MLC por la exportación del bioproducto y/o transferencia de tecnología al exterior.
- Incremento de los rendimientos de los cultivos, disponibilidad de una mayor cantidad de alimentos sanos e inocuos para el consumo de la población.
- Protección del ambiente y la salud humana por disminución del uso de agroquímicos.

Se logró su marca registrada en la OCPI y el registro en el Registro Central de Fertilizantes.

La validación agronómica del BIOJAS<sup>®</sup> se llevó a cabo en diferentes cultivos tales como caña de azúcar, vitroplántulas de piña, en plátano, fresa, toronja, papa y arroz; se obtuvieron resultados satisfactorios de incrementos en los rendimientos, desarrollo de raíces, efectos favorables en respuesta al estrés biótico y abiótico.

El BIOJAS<sup>®</sup> ha sido evaluado específicamente como biocontrolador sobre plantas de piña cv “Cayena lisa”, en fase de plantación en la provincia de Ciego de Ávila, en la que fue efectivo en el ataque de la Chinche harinosa, que representa la plaga más dañina al cultivo por constituir el agente propagador del virus del Will. Esto no parece deberse a un efecto insecticida sino a la inducción de mecanismos de resistencia metabólica de la planta.

Se aplicó para el control de pulgones en el cultivo de habichuela Escambray, ocasionando la muerte del 100% de pulgones y no permitiendo el desarrollo de más brotes de pulgones, de mosca blanca o de trips.

En dosis de 60 mg.L<sup>-1</sup> vs *Sclerotium sp. in vitro* produjo la inhibición de casi el 50 % de crecimiento. En la interacción plátano-*Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 el AJ (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) siempre redujo la presencia del hongo, demostrando acción protectora, aumentó la supervivencia de las plántulas de piña en condiciones *ex vitro* contra *Phytophthora nicotianae var. parasitica*.

En calabacín con *Nesidiocoris tenuis* depredador biológico introducido para control de mosca blanca, pequeños áfidos, pulgón y trips, que estaban afectando a las plantas y los frutos, fue controlado por mezcla conteniendo 25 mg.L<sup>-1</sup> de AJ. Tuvo efectividad sobre berenjenas y pepinos con presencia de oidio.

A partir del BIOJAS® se ha desarrollado un producto inhibidor microbiológico, EVIPOL, que fue evaluado industrialmente en complejos azucareros con resultados satisfactorios.

Las pruebas toxicológicas, ecotoxicológicas, mutagénicas y de irritabilidad del producto obtenido evidenciaron que el producto es inocuo para el hombre.

En marco del desarrollo de este producto se realizó la defensa de un doctorado, en tanto que otra tesis está próxima a terminar. Se defendieron además con éxito seis tesis de diploma y dos tesis de maestría, contribuyéndose así a la formación de recursos humanos. Se aprobó una patente de invención. Se realizaron 39 publicaciones en revistas nacionales y extranjeras de prestigio, seis de ellas en revistas de impacto, y 56 presentaciones en eventos científicos internacionales y nacionales. bComo parte del trabajo realizado se otorgaron seis premios ICIDCA, tres premios MINAZ, dos premios del Fórum municipal y dos premios del Fórum Provincial de Ciencia y Técnica.

## Conclusiones

- Es posible llevar a cabo la producción de ácido jasmónico (AJ) en bioreactores estáticos con cultivo superficial. El sistema es económico ya que no genera gastos energéticos asociados con suministro de aire y agitación y con altos costos por equipamiento.
- Se demostró la presencia en los caldos de *Lasiodiplodia* de otros jasmonatos y otros derivados con interés como RCV. Los metabolitos detectados son similares a los descritos en el metabolismo del AJ en plantas por lo que se sugiere que en estos hongos, la ruta metabólica de biosíntesis del AJ podría ser similar a la descrita en plantas.
- Los resultados obtenidos con el BIOJAS® han demostrado su efecto en el control del hongos fitopatógenos, pequeños áfidos, trips, pulgón, mosca blanca y como inhibidor microbiano en guarapo de caña de azúcar.
- El BIOJAS® estimuló e incrementó el desarrollo de las variables morfológicas de las plántulas de *Spathyphillum* ‘Sensation’, aumentando la masa fresca de las plántulas y el incremento de rendimientos en cultivos como arroz, fresa y papa.
- La producción de BIOJAS® en las instalaciones del ICIDCA con volúmenes de 3000 L/a, suficientes para la satisfacción de la demanda nacional, es altamente rentable, con una ganancia de 400 000 pesos/a y 27 000 USD/a.
- Las pruebas toxicológicas, ecotoxicológicas del BIOJAS® obtenido, evidenciaron que es inocuo y su no toxicidad.

## Referencias bibliográficas

- (1) Abdala, G., Miersch, O., Correa, N., Rosas, S., Detection of Jasmonic Acid in Cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Nat Product Letters 14 55-63, 1999.
- (2) Abdala, G.; O. Miersch; R. Kramal; A. Vigliocco; E. Agostin G. Forchetti; S. Alemanno. 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots.

Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regulation* 40(1): 21-27.

(3) Agrawal, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 3:329–335.

(4) Aldridge, D. C; S. Galt; D. Giles; W. B. Turner. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society. Section C* 1623–1627.

(5) Almeida G., Lorenzo M., y otros. 2001 Efecto de la relación carbono- nitrógeno en la producción de ácido jasmónico por *Botryodiplodia theobromae*. *Revista Sobre los derivados de la caña de azúcar* No.2-3, Vol. XXXV.

(6) Almeida, G.; Klibansky, M.; Altuna, B.; Eng F.; Legra, S.; Armenteros, S. 1999. Algunas consideraciones sobre acerca de la utilización de las fuentes carbonadas en la producción de ácido jasmónico *Revista Iberoamericana de Micología* 16: 146-148.

(7) Altuna, B.; Klibansky, M.; Almeida, G.; Eng, F.; Gonzalez, L.; Saenz, T. 1999. Capítulo Acido Jasmónico en *Manual dos Derivados de Cana-de Acucar*. Ed. ABIPTI-Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica. p. 367-370.

(8) Altuna, B.; Klibansky, M.; Almeida, G.; Eng, F.; Legra, S.; Armenteros, S. 1996. Ácido jasmónico: nuevo regulador del crecimiento de las plantas. Identificación en cepas de *Botryodiplodia theobromae*. *Rev Sobre los derivados de la caña de azúcar (ICIDCA)* XXX (1) 16-21.

(9) Alves da Cunha, M.A., Turmina, J.A., Ivanov, R.C., Barroso, R.R., Marques, P.T., Fonsenca, E., Fortes, Z., Dekker, R., Khaper, N., Barbosa, A.M. 2012. Lasiodiplodan, an Exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on Glucose, Fermentation Kinetics, Rheology and Anti-proliferative Activity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39 1179-1188, 2012.

(10) Ananiev, E. D.; K. Ananieva; I. Todorov. 2004. Effect Of Methyl Ester Of Jasmonic Acid, Abscisic Acid And Benzyladenine On Chlorophyll Synthesis In Excised Cotyledons Of *Cucurbita Pepo* L. (Zucchini). *Bulg. J. Plant Physiol* 30 (1-2): 51-63.

(11) Ananieva, K.; E. D. Ananiev. 2000. Interaction Between Methyl Ester Of Jasmonic Acid And Benzyladenine During The Growth Of Excised Greening Cotyledons Of *Cucurbita Pepo* L. (Zucchini) *Bulg. J. Plant Physiol* 26 (1–2): 48–57.

Anderson, J. P.; E. Badruzsaufari; P. M. Schenk; J. M. Manners; O. J. Desmond; C. Ehlert; D. J. Maclean; P. R. Ebert; K. Kazan. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16:3460-3479.

(12) Andresen, I.; W. Becker; K. Schluter; J. Burges; B. Parthier; K. Apel. 1992. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.* 19: 193–204.

(13) Anónimo. 2010. Agricultura sostenible. Ideas básicas y experiencias. Editorial Asociación ETC Andes, ISBN 978-9972-831-06.5, Lima, Perú, Tercera Edición.

(14) Aragón, C. E.; M. Escalona; I. Capote; D. Pina; I. Cejas; R. Rodriguez; M. J. Can Al; J. Sandoval; S. Roels; P. Debergh; J. Gonzalez-Olmedo. 2005. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) plantlets growing in

temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:550–554.

(15) Beart, M. 1992. Manual de Técnicas Analíticas. ICIDCA, 1992.

(16) Beckman, C. H. 1987. El nature of kilt Diseases of Plants APS. Press. St. Paul. MN. 175.

(17) Bermúdez, I.; Herrera, L.; Orellana, P.; Veitía, N.; Romero, C.; Clavelo, J.; García, L.; Acosta, M.; Padrón, Y. 2002. Estudio en condiciones de campo de poblaciones de los clones de banano “Manzano” (AAB) y Gros Michel (AAA) para la selección de plantas con posible resistencia al Mal de Panamá. *Infomusa* 11(2):7-8.

(18) Berrocal-Lobo, M.; Molina, A. 2004. Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soil borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 763–770.

(19) Berrocal-Lobo, M.; Molina, A.; Solano, R. 2002. Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in Arabidopsis confers enhanced resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal.* 29: 23-32.

(20) Boher, B. 1974. La pourriture du coeur de l’ananas: Etude histologique de l’infection par *Phytophthora pulniiuoru* (BUTL.) BUTL. *Fruits* 29 (11).

(21) Brizuela, A.L., Sánchez, A.J. 1985. Micología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Editorial Combinado Poligráfico Federico Engels, Ciudad de la Habana, Cuba, 32-35, 1985.

(22) Broadbent, D., Hemming, H.G., Turner, W.B. 1968, Preparation of Jasmonic Acid. GB Patent 1286266. Imperial Chemical Industries, Great Britain, 1-3.

(23) Brodhun, F., Feussner, I. 2011, Oxipilins in Fungi. *FEBS Journal* 278 1047-1063.

(24) Browse, J. 2005. Jasmonate: an Oxylin Signal with Many Roles in Plants. *Vitamins and Hormones* 72 431-456.

(25) Bueno, R.L., Almeida, G. 2000. Evaluación morfológica y fisiológica de cultivos del género *Botryodiplodia theobromae* conservados en agua destilada. *Lab Acta* 12 18-20.

(26) Castillo G, Lorenzo M., Redondo D, Ortega G., Michelena G. 2004. Validación de la determinación de ácido jasmónico por HPLC”. *Memorias de Diversificación 2004* pág 742-748 ISBN 978-959-7165-17-1.

(27) Castillo G., Delgado G, Altuna B, Michelena G, Lorenzo M., Redondo D., Bedolla E. y Reádigos R. 2008. Impacto de los métodos cromatográficos para la determinación de fitohormonas biosintéticas en la validación de bioproductos aplicados en la agricultura cañera. *Memorias Diversificación 2008*, ISBN 978-959-7165-16-3.

(28) Castillo G., Michelena G., Nogueiras C., Ortega G., Bello D., Guerra M., Armenteros S., Reádigos R., Crespo D., Mieres G. 2010. Caracterización cromatográfica y espectroscópica de un pigmento rojo obtenido a partir de *Botryodiplodia Theobromae*”. *Revista Sobre los derivados de la caña de azúcar* 44 (3), p. 15-20.

(29) Castillo G., Redondo D., Ortega G., Lorenzo M., Altuna B., Michelena G. 2004. Métodos Cromatográficos para la determinación de Ácido Indol Acético y Acido Jasmónico en caldos de fermentación.. *Revista Cubana de Química* Vol. 16 th, No. 3, ISSN 0258-5595. Sesión de Química Analítica e Inorgánica. D-076.

- (30) Castillo, G., Gregori, B.S., Díaz de Villegas, M.E., Delgado, G., Montano, R., Cejas, G., Gálvez, L.O. 2007. Bioproductos para la agricultura; surgimiento y desarrollo en el Annals of Botany ICIDCA. Revista Sobre los derivados de la caña de azúcar 41:55-65.
- (31) Castillo, G.; Redondo, D.; Eng, F.; Ortega, G.; Altuna, B.; Michelena, G. 2004. Determinación de ácido jasmónico por HPLC en caldos de fermentación. Rev Sobre los derivados de la caña de azúcar XXXVIII (2).
- (32) Cedeño, L., Carrero, C., Mohali, S., Palacios-Prü, E., Quintero, K. 1995. Muerte regresiva en parchita causada por *Lasiodiplodia theobromae* en Venezuela. Fitopatología Venez 8 11-15.
- (33) Cenzano, A., Vigliocco, A., Graus, T., Abdala, G. 2003. Exogenously Applied Jasmonic Acid Induces Changes in Apical Meristem Morphology of Potato Stolons. 91 915-919.
- (34) Choi Min Ho, Yun Hee Park. 1998. Inhibition of lactic acid bacteria in kimchi fermentation by nisin. Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol 8.
- (35) Cipollini, D.F. and Sipe, M.L. 2001. Jasmonic acid treatment and mammalian herbivory differentially affect chemical defenses and growth of wild mustard (*Brassica kaber*) Chemoecology 11 (3):p. 137-143.
- (36) Clarke, J.D.; S. M. Volko; H. Ledford; F. M. Ausubel; X. Dong. 2000. Roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 12:2175-2190.
- (37) Comparot, S. M.; C. M. Graham; D. M. Reid. 2002. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light- and dark-grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. Plant Growth Regulation 38 (21): 21–30.
- (38) Creelman, R. A.; Mullet. J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 266: 355-381.
- (39) Creelman, R. A.; Mullet. J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 4114–4119.
- (40) da Silva, M., Manfio, G.P., Vanderlei Perez, V. 1998. Characterization of Selected Strains of Mucorales using Fatty Acid Profiles. Rev Microbiol (São Paulo) 29 18-22.
- (41) Daquinta, M.; R. Benegas. 1997. Brief review of tissue culture of pineapple. Pineapple News. 3: 7-9.
- (42) De Ascensao, A.; I. A. Dubery. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. Phytochemistry 63: 679–686.
- (43) Demain, A.L. 1986. Regulation of Secondary Metabolism in Fungi. Pure and Appl Chem 58 219-226.
- (44) Desjardins, Y.; C. Hdider; J. De Riek. 1995. Carbon nutrition *in vitro*-regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. En: Aitken Christie, J.; M. L. Smith (eds) Automation and environmental control in plant tissue culture. pp. 441 - 471.
- (45) Dhanhukia, P.C., Thakkaar, V.S. 2007a. Standardization of Growth and Fermentation Criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for Production of Jasmonic Acid. African J of Biotechnology 6 707-712.

- (46) Dhanhukia, P.C., Thakkaar, V.S. 2007b. Response Surface Methodology to Optimize the Nutritional Parameters for Enhanced Production of Jasmonic Acid by *Lasiodiplodia theobromae*. J Appl Microbiol 105 636-643.
- (47) Dhanhukia, P.C., Thakkaar, V.S. 2007c. Significant Medium Components for Enhanced Jasmonic Acid Production by *Lasiodiplodia theobromae* using Plackett-Burman Design. Current Trend in Biotechnology & Pharmacy 1 79-56.
- (48) Directiva 2001 /36 / CE. 2001 Comisión del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario oficial N<sup>o</sup> L 164 de 20 /06 /2001 p 0001 – 0038.
- (49) Donnelly, D. J.; W. E. Vidaver, K. Lee. 1995. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and transfer to soil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 4: 43-50.
- (50) Dunnett Programa. 1991. Versión 1,5, Ecological Monitoring Research División. Environmental Monitoring Systems Laboratory EEC.ECC. Directive 91/414/CE. 1991. Annex II, III. Ecotoxicological studies relative to plant protection products.
- (51) Ellis, C.; I. Karafyllidis; C. Wasternack; J. G. Turner. 2002. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. The Plant Cell 14: 1557-1566.
- (52) El-Sayed, M.; R. Verpoorte. 2004. Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. Plant Growth Regulation 44: 53–58.
- (53) Eng F., Gutierrez-Rojas, M.; Favela-Torres, E. 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 Iberoamericana de Micología 25:188-192.
- (54) Eng, F. 2008. Jasmonatos compuestos de alto valor para la agricultura. Parte 1. Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas. Revista Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 42:88-92.
- (55) Eng, F. 2009. Jasmonatos compuestos de alto valor para la agricultura. Parte 2. Vías de producción. Revista Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 43:1-10.
- (56) Eng, F., Gutiérrez-Rojas, Favela-Torres, E. 1988. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation, *Phytochemistry*, 33, 715-720.
- (57) Escalona, M.; J. C. Lorenzo.; B. González.; M. Daquinta.; J. L. González-Olmedo; Y. Desjardins. C. G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comusus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports 18: 743-748.
- (58) Expediente del BIOJAS. 2013. Registro de Fertilizante. Farbood, M.; Blocker, R.; McLean, L.; Sprecker, M.; McLean, M.; Kossiakoff, N.; Kim, A.; Hagedorn, M. 2001. Bioprocess for the High-yield Production of Food Flavor-acceptable Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate, United States Patent 6333180, International Flavors & Fragrances Inc, IC:C12P 017/02, New York USA, 1-34.
- (59) Feussner, I., Wasternack, C. 2002. The Lipoxygenase Pathway. Annu. Rev. Plant Biol. 53 275-297.

- (60) Fingrut, O.; Flescher, E. 2002. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia* 16(4): p.608-16.
- (61) Fingrut, O.; Rotem, R. and Flescher, E. 2002. Jasmonates: a novel class of anti-cancer agents. < <http://www.tau.ac.il/medicine-/conf-2002/F/F-27.doc>>.
- (62) Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Álvarez, D., Abdala, G. 2007. Bacteria in Sunflower (*Helianthus annuus L.*): Isolation, Characterization, and Production of Jasmonates and Abscisic Acid in Culture Medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 76 1145–1152.
- (63) Franceschi, V. R.; T. Krekling; E. Christiansen. 2002. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *American Journal of Botany* 89:578-586.
- (64) Gabr, M.R., Salch, O.L., Nour, A.H., Shebata, Z.A. 1990. *Botryodiplodia* Fruit Rot of Pear Fruits, Some Physiological and Pathological Studies. *Annals Agric Sci* 35 427-443.
- (65) Gao, X.; X. Zeng; K. Xia; T. Yoshihara; X. Zhou. 2004. Interactive effects of methyl jasmonate and salicylic acid on floret opening in spikelets of Sorghum. *Plant Growth Regulation* 43: 269–273.
- (66) Geneve, R. L. 1991. Patterns of adventitious root formation in English Ivy. *J. Plant Growth Reg.* 10(1): 215-220.
- (67) Genoud, T.; J-P. Métraux. 1999. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends in plant science* 12(4).
- (68) Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., Varin, L. 2003. Biochemical and Molecular Characterization of a Hydroxy Jasmonate Transferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278 17895-17900.
- (69) Gold D.; Pankova-Kholmyansky, I.; Fingrut, O.; Flescher, E. 2003. The antiparasitic actions of plant jasmonates. *J. Parasitol.* Dec;89(6):p. 1242-4.
- (70) González, M. A. 2002. Estudios parciales sobre la presencia de la enzima lipoxigenasa en el hongo *Botryodiplodia theobromae*. Tesis de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 2002.
- (71) González-Olmedo, J. L.; M. Escalona; M. Cid, D. Pina; R. Rodríguez. 2002. Bioproductos en la aclimatización de plántulas de la caña de azúcar. Ed. ICIDCA, La Habana. Tomo III: 459-462.
- (72) González-Olmedo, J. L.; Moreno, A.; Pino, Y.; Pina, D.; Aragón, C.; Escalona, M.; Cid, M.; Rodríguez, R. 2006. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico en la aclimatización de plántulas de especies de interés comercial. En: Educación Cubana (ed). Proceedings Bisse in Memoriam. ISBN: 959-18-0088-6.
- (73) González-Olmedo, J. L.; Z. Fundora; L. A. Molina; J. Abdounour; Y. Desjardins; M. Escalona. 2005b. New contributions to propagation of pineapple (ananas comosus L. merr) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—Plant 41:87–90.
- (74) González-Olmedo, J.; A. Cordova; C. A. Aragon; D. Pina; M. Rivas; R. Rodríguez. 2005a. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plantas de banano (*Musa spp.*) bajo estrés térmico. *InfoMusa* 14 (1): 18-20.
- (75) Grazebrook, J. 2005, Contrasting Mechanisms of Defense Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Ann Rev. Phytopathol* 43 205-227.
- (76) Gross, D.; Parthier, B. 1994. Novel natural substances acting in Plant Growth Regulation. *J. Plant Growth Regulation* 13:p. 93-114, 1994.
- (77) Günther, T., Miersch, O., Fristche, W., Sembdner, G. 1989. Synthetic Medium for

Manufacture of 7-Iso-jasmonic Acid with *Botryodiplodia theobromae*. Patentschrift DD 272869 A1, C12 P7/40, Akademie der Wissenschaften, Halle Deutsche Demokratische Republik, 1-5.

(78) Gunther, T., Miersch, O., Fritche, W., Sembdner, G. 1990. Patentschrift DD279688A1, Akademie der Wissenschaften, Deutsche Demokratische Republik. Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure.

(79) Hamberg, M. Gardner, H. W. 1992. Oxylin pathway to Jasmonates. Biochemistry and Biological Significance. Biochemica et Biophysica Acta.

(80) Harms, K., I. Ramirez; H. Peña-Cortés. 1998. Inhibition of Wound-Induced Accumulation of Allene Oxide Synthase Transcripts in Flax Leaves by Aspirin and Salicylic Acid. Plant Physiol. 118 (3): 1057–1065.

(81) Hewitt, W.B.. Webster, R.K.. Satour, M.M. 1971. Studies on *Diplodia* and *Diplodia*-like Fungi. Effects of pH, Temperature, Light and Vitamins on Certain Taxonomic Characters. Hilgardia 41 81-94.

(82) Holt, SM; Cote GL, 1998. Applied and Environmental Microbiology.

(83) Horonkova. M.; H. Zahradnickova; P. Simek; A. Heydova. 2003. The role of abscisic in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum. 46(4): 535-541.

(84) Inho, G., Kyoungju, K., Yonghwi, K. 2006. Optimal Conditions for the Production of (+)-Jasmonic Acid by *Diplodia gossypina* ATCC 10936. The Korean Journal of Microbiology 42 210-215.

(85) Ishiguro, S.; A. Kawai-Oda; J. Ueda; I. Nishida; K. Okada. 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. Plant Cell 13: 2191–2209.

(86) Jernerén F, Hoffmann I, Oliw E.H. 2010. Linoleate 9R-dioxygenase and Allene Oxide Synthase Activities of *Aspergillus terreus*. Arch Biochem Biophys 495 67-73.

(87) Jernerén, F.; Eng, F.; Hamberg, M; Oliw, E. 2012. Linoleate 9R-Dioxygenase and Allene Oxide Synthase Activities of *Lasiodiplodia theobromae*. Fredrik Jernerén, Felipe Eng, Mats Hamberg y Ernst Oliw (2012). Lipid 47:65-73.

(88) Kariola, T.; G. Brader; J. Li; E. T. Palva. 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. The Plant Cell 17:282-294.

(89) Kaur Gidda, S.; Miersch, O.; Levitin, A .;Schmidt, J.; Wasternack, C. and Varin, L. 2003. Biochemical and Molecular Characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. J. Biol.Chem. 278 (20): p. 17895-17900.

(90) Khatib M.; C. Lafitte; M-T. Esquerre-Tugaye, A. Bottin; M. Rickauer. 2004. The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. New Phytologist 162 (2): 501- 510.

(91) Koda, Y. 1992. The Role of Jasmonic acid and Related compounds in the Regulation of Plant Development. Int. Rev.of Cytology, 135: 155- 199.

(92) Kozai, T; S. A. Zobayed. 2000. Acclimatization. En: Spier, R. E., (ed.).



Encyclopedia of Cell Technology. John Wiley Sons, Inc, Vol. 1: 1-12.

(93) Lee, J.; B. Parthier; M. Lobler. 1996. Jasmonate signalling can be uncoupled from ABA signalling in barley – identification of jasmonate-regulated transcripts that are not induced by ABA, *Planta* 199: 625–632.

(94) Lee, J.; T. Vogt; B. Hause; M. Lobler. 1997. Methyl jasmonate induces an O-methyl transferase in barley, *Plant Cell Physiol.* 38: 851–862.

(95) Li, J.; Brader, G.; Palva, T. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defence. *Plant Cell.* 16:319-331.

(96) Linares, A.M.P, Hernandez, C., França, S., Lourenço, M.V. 2010. Actividade fitorreguladora de jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*. *Horticultura Brasileira* 28 430-434.

(97) Lorenzo M. y colaboradores. 2005. Análisis por TLC de jasmonatos obtenidos por vía fermentativa II Conferencia Internacional de Química, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Fac. de Química y Farmacia. (2005).

(98) Lorenzo M., González J. 2002. Determinación de ácido jasmónico (AJ) y el ácido 9,10 dihidrojasmónico (ADHJ) en fermentación de cepas de *Botryodiplodia theobromae* por cromatografía gaseosa. *J Revista ICIDCA*, No.3, Vol. XXXVI.

(99) Lorenzo M., González J., Bermello A. Ortega G. 2004. Validación de la técnica: “Determinación de ácido jasmónico (AJ) en fermentación de *Botryodiplodia theobromae* por cromatografía gaseosa”. *Memorias de Diversificación 2004* pág 749-758 ISBN 978-959-7165-17-1.

(100) Lorenzo, O.; J. M. Chico; J. J. Sanchez-Serrano; R. Solano. 2004. Jasmonate-Intensive1encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate regulated defence responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, en prensa. 1: 2-6.

(101) Lorenzo, O.; R. Solano. 2005. Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net* 1: 1-16

(102) Lösel, D.M. 1988. Fungal Lipids. In: C. Ratledge and S.G. Wilkinson Eds., *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press Ltd., London UK, 699-806..

(103) Lou, Y.-G; M-H. Du; T. C. J. Turlings; J-A. Cheng; W-F. Shan. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. *Journal of Chemical Ecology.* 31 (9).

(104) Maksymiec, W.; Z. Krupa. 2007. Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. [Biologia Plantarum](#) 51(2): 322-326.

(105) Manual de Aseguramiento De La Calidad. 2002. Laboratorio Bioplant Export. Micropropagación de *Spathyphillum* ‘Sensation’. Centro de Bioplant, UNICA Pp2.

(106) Maslenkova, L.; S. Toncheva; Y. Zeinalov. 1995. Effect of abscisic acid and jasmonic acid (or JA-Me) on the photosynthetic electron transport and oxygen evolving reactions in pea plants. *BULG. J. PLANT PHYSIOL.* 21 (4): 48–55.

(107) Mc Conn, M.; J. Browse. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant, *Plant Cell* 8: 403–416.

- (108) Michelena G., Altuna B., Almeida G., Carrera E. 2000. Study of stability of the Jasmonic acid from *B. theobromae*. Revista Sobre los derivados de la caña de azúcar Vol. XXXIV, 2.
- (109) Michelena G., Bell A., Martínez A., Carrera E. y otros. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección del jugo de caña en un central azucarero. . Memorias de Diversificación 2004. ISBN 959-7165-17-1.
- (110) Michelena G., Carrera E., Bell A., Altuna B., Almeida G. 2001. Separation Processes of the Jasmonic acid from *B. theobromae* strain 715. Tecnología, Ciencia y Educación. (IMIQ), 16 (1): 12-19.
- (111) Michelena G., Lorenzo M., y otros. 2002. Impacto del Acido jasmónico, obtenido por via biotecnológica, en el control biológico de plagas que afectan la caña de azúcar.. Libro Resumen del congreso Diversificación 2002 Tomo II pág 221-223 ISBN 959-7165-11-2.
- (112) Michelena, G. 2001. Evaluación del Acido Jasmónico en Experimentos sobre Caña de Azúcar. Etica de Villa Clara. CENPALAB. Subdirección de Biotecnología. ICIDCA.
- (113) Michelena, G. 2001. Evaluación del ÁcidoJasmónico en Experimentos sobre Caña deAzúcar. Subdirección de Biotecnología,ICIDCA, 2001.
- (114) Michelena, G., Altuna, B, Almeida G, Eng F., Lorenzo M., y otros. 2002 Estudios en la producción por vía fermentativa del ácido jasmónico. Libro Resumen del congreso Diversificación 2002 Tomo II pág 391-393ISBN 959-7165-11-2.
- (115) Michelena, G.; Almeida, G.; Altuna, B.; Eng, F.; Legrá, S.; Oliveros, M.; Armenteros, S. 2005. Efecto inhibitor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. Rev Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar XXXIX (3), 3-7.
- (116) Michelena, G.; Saura, G.; Altuna, B.; Villa, P.; Díaz de Villegas, M.E.; Klibansky, M.; Almeida, G.; Rodríguez, H.; Eng, F.; Fernández, R.; Frías, A. 2002. Bioproductos y caña de azúcar. Una experiencia cubana. Rev. Agroenfonque Año XVI, 120 28-32.
- (117) Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., Wasternack, C. 2008. Hydroxylated Jasmonates are Commonly Occurring Metabolites of Jasmonic Acid Contribute to a Partial Switch-off in Jasmonate Signalling. New Phytol 117 114-127.
- (118) Miersch, O., Preiss, A., Sembdner, G., Shreiber, K. 1987. (+)-7-Isojasmonic Acid and Related Compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 26 1037-1039.
- (119) Miersch, O., Schmidt, J., Sembdner, G., Shreiber, K. 1989. Jasmonic Acid-like Substances from Culture Filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 28 1303-1305.
- (120) Miersch, O., Schneider, G., Sembdner, G. 1991, Hydroxylated Jasmonic Acid and Related Compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry 30 4049-4051.
- (121) Miersch, O.; Preiss, A; Sembdner, G; Shreiber, K. 1987. ( + ) -7- Isojasmonic Acid and related Compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry. 26: 1037- 1039.
- (122) Miersch, O.; Sembdner, G.; Schreiber, K.; Richter, K.; Kochmann, W.; Fritche, W. 1984. Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäureanalog. Patentschrift DD 216734 A1, Akademie der Wissenschaften, Halle Deutsche Demokratische Republik, 1-7.

- (123) Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.W., Tudzynski, B. 2003. AREA Directly Mediates Nitrogen Regulation og Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but Its Activity is not Affected by NMR. *Mol Microbiol* 47 975-991.
- (124) Miller, A.; C. Tsai; D. Hemphill; M. Endres; S. Rodermeil; M. Spalding. 1997. Elevated CO<sub>2</sub> effects during leaf ontogeny. A new perspective on acclimatization. *Plant Physiology*. 119: 1195-1200.
- (125) Motl, O.; Novotny. 1966. AdsorptionChromatography. En: Mikes, O.Laboratory handbook of Chromatographicmethods. London: D. Van Nostrand.Series in Analytical Chemistry. D. VanNostrand Company Ltd., p.189-228 London, 196
- (126) Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*. 15: 473-487.
- (127) Nekrásov, B.V. 1981. Química general. Cuarta edición revisada y ampliada, Editorial MIR Moscú, 118.
- (128) Nieto, K.F., Frankenberg, W.T., Microbial Production of Cytokinin. *Soil Biochemistry* 6 191-248, 1990.
- (129) Norma Española ISO 7346-1. 1998. Calidad de agua. Determinación de la Toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce Brachidanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei Cyprinidae), Parte I. Método estático. (ISO 7346-1,1996).
- (130) O'Donoel, P. ; Schmelz, E. ;Moussatche, P. ; Lund, S. ; Jones, J. B. ;Klee,H. J. 2003. Susceptible to intolerance-arange of hormonal actions in a susceptibleArabidopsis pathogen response. *The PlantJournal* 33: p. 245-257.
- (131) OECD. 1984. Guideline for testing of chemicals Acute toxicity test # 207.
- (132) OECD. 1992. Guideline for testing of chemicals 17 Jul. Fish Acute toxicity test (203).
- (133) Ortega, G, Michelena, G.; Altuna, B. 2003. Instructivo de Aplicación de Bioestimuladores. Informe ICIDCA.
- (134) Ortega, G. M.; Oliveros, M.; Lorenzo, M.;Michelena, G.; Carreras, E.; Altuna, B;Armenteros, S.; Legrá, S. 2003. Separación y purificación de ácido jasmónico obtenido por vía microbiana. *Revista ICIDCA. SobreLos Derivados de la Caña de Azúcar,LaHabana, XXXVII (1): p. 44-50.*
- (135) Ortega, G. y Lima Y. 2004. Separación y purificación de ácido jasmónico en caldos de fermentación. Proyecto Técnico.
- (136) Pateman, J.A., Kinghorn, J.R. 1975. Nitrogen Metabolism. In *The Filamentous Fungi*, Vol. 2 Biosynthesis and Metabolism. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, England, 160-161.
- (137) Pelacho, A. M; A. M. Mingo-Castel. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol*. 97 (3): 1253-1255
- (138) Peña-Cortés, H.; J. Fisahn; L.Willmitzer. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4106–4113.
- (139) Ploetz, R. C. 1994. *Fusarium* kilt and IMTP Phase II. In the Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. INIBAP. Montpellier France.57-69.
- (140) Popova, L. P.; S.G. Vaklinova. 1988. Effect of jasmonic acid on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Plant Physiol*.

133, 210–215.

- (141) Porras, R.J. 1991. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. In: H Scheer (ed). Chemistry of Chlorophyll. CRC Press Inc Boca Raton Ann Arbor Boston London. pp320.
- (142) Pozo, L. 1997. Aspectos de la Abscisión Precoz de Frutos Cítricos y de su Regulación endógena en las condiciones climáticas de Cuba. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.
- (143) Preece, J. E.; E. G. Sutter. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C.; R. H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic publishers. pp 71-93.
- (144) Raíces, M; Moleino, M. C; Li, L. M; Morera, V; Roca, H; Delgado, J; Cremata, J; Herrera, L. 1991. Biotecnología Aplicada Vol 8 (2).
- (145) Reinbothe, C.; B. Parthier; S. Reibothe. 1997. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta* 201: 281–287.
- (146) Resolución No. 107 – 04. 2004. Sobre Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental
- (147) Rodríguez, P. 1999. Estudios de síntesis de ácido jasmónico por vía biotecnológica. Tesis de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1999.
- (148) Rodríguez, R. 2005. Aclimatización de Caña de Azúcar (*Saccharum sp.* Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas. Pp.100.
- (149) Rodríguez, Y.; M. Mosqueda; B. Companioni; M. Arzola; O. Barras; M. C. Pérez; J.C. Lorenzo; R. Santos. 2002. Bioassay For in vitro Differentiation of Pineapple Cultivar Resistance Levels to Herat Rot Disease. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 613-616.
- (150) Roetschi, A.; Siammour, A. ; Belbahri, L. ;MauchMani, B. 2001. Characterization of an Arabidopsis- phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signaling. *Plant Journal* 28 (3): p. 293-305, 2001.
- (151) Rotem, R.; Heyfets, A.; Fingrut, O.; Blickstein, D.; Shaklai M. and Flescher, E. 2005. Jasmonates: Novel Anticancer Agents Acting Directly and Selectively on Human Cancer Cell Mitochondria. *Experimental Therapeutics, Molecular Targets and Chemical Biology Cancer Research* 65, (1): p. 1984-1993.
- (152) Rudus, I., Kepczynka, E., Kepczykbi, J., Wastemack, C., Miersch, O. 2005. Changes in Jasmonate and 12-Oxophytodienoic Acid Contents of *Medicago sativa* L. During Somatic Embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum* 27 497-504.
- (153) Samaila, D.; Ezekwudo, D. E., Kidist K; Yimam J; Elegbede. A. 2004. Bioactive plant compounds inhibited the proliferation and induced apoptosis in human cancer cell lines in vitro. *Transactions of the Integrated Biomedical Informatics & Enabling Technologies Symposium Journal* 1: p. 34-42.
- (154) Sanders, P. M.; P. Y. Lee; C. Biesgen; J. D. Boone; T. P. Beals; E. W. Weiler; R. B. Goldberg. 2000. The Arabidopsis delayed dehiscence1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12: 1041-61.

- (155) Saniewski, M.; J. Czapski. 1983. The effect of methyl jasmonate on lycopene and b-carotene accumulation in ripening red tomatoes. *Experientia (Basel)* 39: 1373–1374.
- (156) Santamaría, J., Bayamon, P. 2005. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves. *Microbial Ecology* 50 1-8, 2005.
- (157) Sanz, L. C.; Fernández, J.C; Gómez, E. Vioque, B. Olias, J. M. 1993. Effect of methyl jasmonate on ethylene biosynthesis and stomatal closure in leaves. *Phytochemistry*. 33. 285- 289.
- (158) Schaller, F. 2001. Enzymes of the Biosynthesis of Octadecanoid-derived Signaling Molecules. *J of the Experimental Botany* 52 11-23.
- (159) Schilmiller, A. L.; G.A. Howe. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 369-377
- (160) Selbmann, L., Crognale, C., Petruccioli, M. 2003. Exopolisaccharide Production by Filamentous Fungi: the Example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84 135-145.
- (161) Selbmann, L., Crognale, C., Petruccioli, M. 2004. Beta-glucan Production by *Botryosphaeria rhodina* in Different Bench-top Bioreactors. *J of Applied Microbiology* 95 1074-1081.
- (162) Semdbner, G. y Parthier, B. The biochemical and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 44: p.569-589,1993.
- (163) SIGMA. 1992. Cell Culture Catalogue. Sigma chemical Company. ST. Louis. MO USA. pp. 216.
- (164) Skrzpek, E., Miyamoto, K., Saniewski, M., Ueda, J. 2005. Identification of Jasmonic Acid and its Methyl Ester as Gum-inducing Factors in Tulips. *J of Plant Research* 118 27-30.
- (165) Stahl, P.D., Klug, M.J. 1996. Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl and Environ Microbiol* 62 4136-4146.
- (166) Standard Guide. 1988. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Test With Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, E 729/88 American Society Testing Materials, Philadelphia, PA. Approved Nov.21.
- (167) Staswick, P. E.; W. Su; S. H. Howell. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6837–6840.
- (168) Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versión 11.5 para Windows Copyright© SPSS, INC. 1998.
- (169) Statistical Package Scientific System. 1999.
- (170) Stintzi, A; J. Brower. 2000. The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10625-10630.
- (171) Stout, M.J., Thaler, J., Thomma, B. 2006. Plant Mediated-Interaction between Pathogenic Microorganisms and Herbivorous Arthropods. *Ann Rev Entomol* 51 663-689.
- (172) Suhita, D.; A. S. Raghavendra; J. M. Kwak; A. Vavasseur. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during

methyl jasmonate- and abscisic acid-Induced stomatal closure. *Plant Physiology* 134:1536-1545.

(173) Swiatek, A.; A. Azm; E. Witters; H. Van Onckelen. 2003. Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *BULG. J. PLANT PHYSIOL. SPECIAL ISSUE*: 172–178

(174) Swiatek, A.; M. Lenjou; D. Van Bockstaele; D. Inze; H. Van Onckelen. 2002. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 128: 201-211.

(175) Swiatek, A.; W. Van Dongen; E. L. Esmans; H. Van Onckelen. 2004. Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol.* 135 (1): 161–172.

(176) Thaler, J. S. 1999. Induced resistance in agricultural crops: Effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato Plants. *Environ. Entomol.* 28 (1): 30-37.

(177) Thaler, J.S., Owen, B., Higgins, V.J., The Role of Jasmonic Acid in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Life Styles. *Plant Physiol* 135 530-538.

(178) Thaler, J.S., Stout, M.J., Karban, R., Duffey, S.S. 2001. Jasmonate-mediated Induced Plants Resistance Affects a Community of Herbivores. *Ecol Entomol* 26 312-324.

(179) Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., Arst, H.N. 1995. The *Aspergillus* Pac C Zinc Finger Transcription Factor Mediates Regulation of Both Acid- and Alkaline- Expressed Genes by Ambient pH. *The Embo Journal* 14 779-790.

(180) Tsukuda, K., Takahashi, K., Nabeta K. 2011, Biosynthesis of Jasmonic Acid in a Plant Pathogenic Fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 71 2019-2023.

(181) Tung, P.; T. S. Hooker; P. A. Tampe; D. M. Reid; T. A. Thorpe. 1996. Jasmonic acid: Effects on growth and development of isolated tomato roots cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences.* 157 (6): 713-721.

(182) Ueda, J.; J. Kato. 1980. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Arthemisia absinthium* L.). *Plant Phys.* 66: 246–249.

(183) Ueda, J.; Kato, J. 1980. Isolation and Identification Senescence Promoting Substance from Wormwood (*Arthemisiaabsinthium* L) *Plant Physiol.* 66: p. 246-249, 1980.

(184) Ueda, J.; Miyamoto, K.; Kamisaka, S. 1994. Separation of a New Type of Plant Growth Regulator, Jasmonates by chromatographic procedures. *Journal of Chromatography A.* 658: 129-142

(185) Ueda, J.; Miyamoto, K.; Kamisaka, S. Separation of a New Type of Plant Growth Regulator, Jasmonates by chromatographic procedures. *Journal of Chromatography A.* 658: p. 129-142, 1994.

(186) United States Environmental Protection Agency. 1995. (USEPA) Methods for acute toxicity test fish, macroinvertebrate, and amfhibians. *Ecol Res. Ser. Epa – 660 / 3 – 75 – 009.*

(187) United States Environmental Protection Agency Prevention. 1996. Pesticides y Toxic substances (7101) EPA 712-C-96-118 April. *Ecological Effects*

Test Guidelines. OPPTS 850. 1075. Fish Acute Toxicity test, freshwater and marine.

(188) Van Dyk, M.S., Kock, J.L., Botha, A. 1994. Hydroxy Long-chain Fatty Acids in Fungi. *World J of Microb & Biotech* 10 495-504,.

(189) Van Huylenbroeck, J. M.; J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathyphillum* Petite plantlets. *Plant Science*. 111: 19-25.

(190) Van Huylenbroeck, J. M.; A. Piqueras; P. C. Debergh. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*. 134: 21-30.

(191) Van Huylenbroeck, J. M.; A. Piqueras; P. C. Debergh. 2000. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*. 155: 59-66.

(192) Van Huylenbroeck, J. M.; P. C. Debergh. 1992. Acclimatization of micropropagated *Gerbera jamesonii* use of chlorophyll fluorescence. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 57/4a: 1575-1579.

(193) Vick, B.A., Zimmerman, D.C. 1984. Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol* 75 458-461.

(194) Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia* Febrero 68-75.

(195) Wasternack, C. 2006. Oxylipins: Biosynthesis, Signal Transduction and Action. In: "Plant Hormone Signaling". Hedden, P.; Thomas, S. eds. *Annual Plant Reviews*, Blackwell, Oxford, UK, 185-222.

(196) 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.

(197) 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.

(198) Wasternack, C., Kombrink, E. 2010. Jasmonates: Structural Requirement for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. *ACS Chemical Biology* 5 63-77.

(199) Wasternack, C.; O. Miersch; R. Kramell; B. Hause; J. Ward; M. Beale; W. Boland; B. Parthier; I. Feussner. 1998. Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett/Lipid* 100 (4-5): 139-146.

(200) Weidhase, R. A.; Krammell, H. M.; Lehmann, J.; Liebisch, H. W.; Lerbs, W.; PB. 1987 Methyl Jasmonate-induced changes in the Polypeptide Pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sci*. 51: 171-186.

(201) Yaguchi, Y., Nakamura, S. 1992. Stem-end Rot of Papaya and Its Pathogens. *Ann Phytopath Soc Japan* 58 30-36.

(202) Yanes, E.; J. L. González-Olmedo; R. Rodríguez. 2000. A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Newslett. Pineapp. Int. Soc. Hort. Sc.*7: 24.

(203) Yen, C. C.; H. S. Tsay; J. H. Yehh; F. Y. Tsai; C. Y. Sahih; C. H.; Kao. 1995. A comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on some rice physiological processes. *J. Plant Growth Regul.* 14: 23-28.

(204) Yu, J.H., Keller, N. 2005. Regulation of Secondary Metabolism in

Filamentous Fungi. *Ann Rev Phytopathol* 43 437-458.

(205) Ziegler, J.; Keinanen, M.; Baldwin, I.T. 2001. Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, 58 (5): p. 729-738, 2001.

(206) ZIV, M. 1995. *In vitro* acclimatization. En: Aitken-Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, pp 493 – 516.