

Efecto de los extractos intercelulares de hojas de bananos inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA)

Michel Leiva Mora*, Jean Pierre Bussogoro, Phillipe Lepoivre. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Cuba. Carretera a Camajuaní Km 5.5. CP 54290. e-mail: lmichele@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

Algunos patógenos foliares en su proceso de infección, ocupan los espacios intercelulares de los tejidos afectados, facilitado por la producción y difusión de toxinas que sensibilizan las células de los tejidos adyacentes. Debido a la ausencia de bioensayos repetibles aún se desconocen los efectos fisiológicos de varias fitotoxinas sobre los sistemas membranosos celulares de los tejidos afectados. En el presente trabajo se extrajeron contenidos intercelulares de hojas de bananos sin inocular e inoculadas con diferentes cepas de *Mycosphaerella fijiensis*. El efecto de los mismos sobre cloroplastos del cv Grande naine se evaluó mediante la evolución de la absorbancia (595 nm) del reactivo de Hill (DCPIP), mezclado con 810 μ l de la suspensión de cloroplastos y 99 μ l del contenido intercelular. Se observó una correspondencia entre la intensidad de los síntomas en las plantas inoculadas y el porcentaje de inhibición del intercambio electrónico de los contenidos intercelulares. Los contenidos intercelulares procedentes de hojas inoculadas con la cepa I1 (virulenta) tuvieron un efecto inhibitor superior al de hojas inoculadas con la cepa G1 (menos virulenta). Los procedimientos empleados en este trabajo permitirán estudiar con mayor profundidad, la interacción *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. aspecto de vital interés para el desarrollo de futuros programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: bioensayos fisiológicos, interacción hospedero patógeno, mejoramiento de bananos, sigatoka negra

ABSTRACT

Some foliar pathogens colonize intercellular spaces of damage tissues during infection process, mediated by toxins production and diffusion to kill adjacent healthy cells. Due to the absence of reliable bioassays, the physiologic effects of several phytotoxins are still ignored on cellular membranous systems of the affected cells. In the present work it was extracted the intercellular content from not inoculated and inoculated banana leaves with different *Mycosphaerella fijiensis* strains. Their effects on chloroplasts of Grande naine cv were evaluated by the absorbance evolution (595 nm) of Hill reactive (DCPIP), mixture with 810 μ l of chloroplasts suspension and 99 μ l of the intercellular contents. The electronic exchange on chloroplasts suspension was inhibited by intercellular contents of inoculated leaves. The intercellular contents from leaves inoculated with I1 (high virulence) strain had a major inhibitor effect respect to leaves inoculates with G1 strain (low virulence), showing a correspondence between the inhibitor effect of intercellular contents and the affection levels of affected tissues. The procedures used in this work will let to make studies concerned with *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp interactions and the future breeding programs.

Key words: banana breeding, black Sigatoka, host pathogen interaction, physiological bioassays

INTRODUCCIÓN

La raya negra de la hoja, o Sigatoka Negra, como se conoce en el continente americano, es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar de los plátanos y bananos. La misma produce grandes pérdidas del área fotosintética tanto por la acción del patógeno como de sus toxinas difundidas (Mourichon, 2000).

Alrededor de cinco compuestos tóxicos han sido aislados y caracterizados a partir del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* (Upadhyay *et al.*, 1990, Stierle *et al.*, 1991). El juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinone) ha mostrado la mayor actividad biológica al producir necrosis foliar en varios cultivares de bananos (Molina y Krausz, 1988, Harelimana *et al.*,

1997), es por ello que actualmente constituye la toxina mejor estudiada y caracterizada de este patógeno.

Yoder (1980), para demostrar el papel de una toxina como determinante de la patogenicidad o virulencia sugirió: aislar la toxina de los tejidos enfermos; reproducir los síntomas de la enfermedad al aplicarla en tejidos de plantas sanas, evaluar la posible correspondencia entre la especificidad de la toxina y del patógeno sobre el hospedero y determinar la correlación entre la virulencia del patógeno y la producción de la toxina.

El mecanismo de acción de varias fitotoxinas aún se desconoce a pesar de las nuevas herramientas que se aplican para el estudio de las mismas. Sin embargo la acción de algunas sobre los tejidos

afectados, han demostrado que organelos como cloroplastos y mitocondrias pueden afectarse en su normal funcionamiento, producto a la acción de las mismas (Allen *et al.*, 1991, Khomoto *et al.*, 1995, Walton *et al.*, 1995, Llácer *et al.*, 1996).

Algunos patógenos foliares en su proceso de infección, ocupan los espacios intercelulares de los tejidos parenquimatosos, facilitado por la difusión de compuestos tóxicos que sensibilizan las células de los tejidos adyacentes. En tal sentido varios autores han recuperado los contenidos intercelulares de tejidos infectados para evaluar, la producción de toxinas por parte del patógeno, la presencia de moléculas señales elaboradas por la planta, la detección y caracterización de moléculas asociadas con la respuesta defensiva contra el patógeno, comparar los niveles de virulencia entre diferentes aislados, entre otros (Laisk, *et al.*, 1989, Luwe, *et al.*, 1993, Riveros y Lepoivre, 1994, Busogoro, 1999, Finalé *et al.*, 2002).

A pesar de ello aún se desconocen varios de los efectos fisiológicos de las toxinas producidas y difundidas por patógenos fungosos dentro de los tejidos afectados, debido a la ausencia de bioensayos repetibles que permitan evaluar la acción de las mismas sobre los sistemas membranosos celulares.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como principal objetivo: evaluar el efecto de los extractos intercelulares de hojas sin inocular e inoculadas con cepas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de banano procedentes del cultivo *in vitro* del cv Grande naine (AAA), las mismas fueron aclimatizadas en macetas de dos litros de capacidad. Como sustrato se empleó una mezcla de 30% de compost y 70% de vermiculita. Se aplicaron riegos de 5 min de duración a intervalos de 30 min, mediante un cronómetro automático. Se empleó una fuente de iluminación artificial con un fotoperíodo de 16h luz y 8h de oscuridad. A los cuatro meses de edad fueron seleccionadas plantas con un tamaño de 30-40 cm y al menos cinco hojas fisiológicamente activas.

Cepas de *M. fijiensis* utilizadas

Para la realización de las inoculaciones artificiales en condiciones controladas se usaron las cepas de *M. fijiensis* I1 (virulenta) y G1 (menos virulenta), obtenidas de la colección de cultivos del CIRAD (Francia) y conservadas a -80°C en tubos eppendorf

de 1 ml que contenían 0.5 ml de glicerol al 25% como criopreservante, durante cinco años en el laboratorio de Patología Vegetal de Gembloux (Bélgica).

Inoculación de las plantas en condiciones controladas

Placas de Petri 10 cm de diámetro que contenían 20 ml del medio de cultivo sólido V-8 (200 ml de jugo V-8, 0.2 g de CaCO_3 , 800 ml de agua destilada, 30 g de agar, pH 6.0), fueron sembradas con una suspensión de micelio y esparcidas con espátula de Drigalski. Las mismas fueron incubadas a 25°C durante 10 días con luz constante de $20 \mu\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad. Discos (2) de micelio de 1 cm de diámetro, fueron introducidos bajo cabina de flujo laminar en Erlenmeyer de 200 ml que contenían 50 ml del medio de cultivo líquido V-8 (200 ml de jugo V-8, 0.2 g de CaCO_3 , 800 ml de agua desionizada, pH 6.0) y se incubaron en condiciones de agitación (130 rpm) y a temperatura ambiente.

La preparación del inóculo se realizó según lo descrito por Leiva (1998). Se calculó la concentración final mediante un hematocímetro (Neubauer) y se ajustó posteriormente a un valor aproximado de 10^5 ufc.ml^{-1} . Las tres últimas hojas abiertas de plantas de cuatro meses de edad fueron inoculadas por el envés mediante un pincel y posteriormente fueron colocadas durante tres días con humedad saturante. Las mismas se trasladaron a un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Extracción de los contenidos intercelulares

A los 60 días después de la inoculación en condiciones controladas, hojas de plantas inoculadas y sin inocular fueron lavadas con agua desionizada estéril tres veces y secadas con papeles de filtro Whatman estériles. Las mismas fueron cortadas en pequeños fragmentos que fueron colocados en recipientes de cristal de 200 ml que contenían 100 ml de una solución de metanol al 10%. Los recipientes se colocaron en una cámara de vacío con una presión de succión de 25 mbar, durante dos horas.

La recuperación de los contenidos intercelulares se realizó a través de dos ciclos de centrifugación a 3200 g durante 10 min. El contenido recuperado se transfirió mediante micropipeta de 1000 μl a tubos eppendorf de 2 ml, los cuales fueron cubiertos con papel de aluminio y conservados a 4°C.

Suspensión de cloroplastos

Para la obtención de la suspensión de cloroplastos del cv Grande naine se empleó el protocolo utilizado por Triboush (1998), la concentración de los mismos se calculó mediante un hematocímetro Thomas y se ajustó a un valor de 14×10^6 cloroplastos. ml^{-1} . Los mismos fueron conservados a 4°C.

Montaje de los ensayos

En cubetas espectrofotométricas plásticas desechables de 1.5 ml de capacidad, fueron preparados los siguientes tratamientos:

Ensayo a: Comparación del efecto de los contenidos intercelulares de hojas sin inocular e inoculadas con M. fijiensis (cepa I1) sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

Tratamiento 1: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l del contenido intercelular de hojas inoculadas con la cepa I1, 200 μ l de DCPIP (dicloro-fenol-indol-fenol), 10 μ M.

Tratamiento 2: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l del contenido intercelular de hojas sin inocular, 200 μ l de DCPIP, 10 μ M.

Control: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l de una solución de metanol al 10%, 200 μ l de DCPIP, 10 μ M.

Ensayo b) Comparación del efecto de los contenidos intercelulares de hojas inoculadas con cepas de M. fijiensis que diferían en virulencia (cepas I1 y G1) sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

Tratamiento 1: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l del contenido intercelular de hojas inoculadas con la cepa I1, 200 μ l de DCPIP, 10 μ M.

Tratamiento 2: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l del contenido intercelular de hojas inoculadas con la cepa G1, 200 μ l de DCPIP, 10 μ M.

Control: 891 μ l de suspensión de cloroplastos, 99 μ l del contenido intercelular de hojas sin inocular, 200 μ l de DCPIP, 10 μ M.

El contenido vertido en cada cubeta fue homogeneizado mediante una micropipeta de 1000 μ l. Se empleó una lámpara incandescente con una intensidad de 23 μ mol. $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ como fuente de iluminación.

El intercambio electrónico de la suspensión de cloroplastos para cada tratamiento se evaluó mediante la lectura de absorbancia (595 nm). Se realizaron dos mediciones de la absorbancia (antes de iluminar la suspensión de cloroplastos y después de 5 min de iluminación). Por cada tratamiento fueron empleadas cinco réplicas así como para el control. Para la lectura de absorbancia se empleó un espectrofotómetro (Secoman de seis cubetas con plataforma giratoria).

El decrecimiento de la absorbancia de los tratamientos respecto al control, permitió calcular el

porcentaje de inhibición del contenido intercelular sobre el intercambio electrónico en la suspensión de cloroplastos aislados a través de la siguiente fórmula, $\%I = 100 - (100d_e/d_c)$, donde d_e , representa el decrecimiento de la absorbancia en la suspensión de cloroplastos y el DCPIP mezclada con el contenido intercelular de hojas de bananos inoculadas con cepas de *M. fijiensis*, d_c representa el decrecimiento de la absorbancia en la suspensión de cloroplastos y el DCPIP mezclada con metanol al 10%. A los 5 min de iluminación se realizó la lectura de la absorbancia.

Análisis estadístico

Se empleó el paquete estadístico SPSS/SS versión 9.0 para Windows. Se utilizó un ANOVA de clasificación doble para el análisis estadístico de los datos. Para la comparación de las medias de los tratamientos se usó la prueba t-student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo a: Comparación del efecto de los contenidos intercelulares de hojas sin inocular e inoculadas con M. fijiensis (cepa I1) sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

Los extractos intercelulares obtenidos a partir de hojas inoculadas permitieron inhibir el intercambio electrónico de la suspensión de cloroplastos, lo cual demostró la presencia de compuestos fitotóxicos liberados en los tejidos colonizados por el hongo. El efecto inhibitor de los extractos intercelulares, procedentes de hojas inoculadas con la cepa I1 fue superior estadísticamente respecto al resto de los tratamientos. El contenido intercelular de hojas sin inocular, difirió respecto al control, debido al inóculo secundario desarrollado durante los 60 días de duración del experimento, donde se observaron ligeros síntomas en las hojas de las plantas sin inocular (Figura 1).

Busogoro (1999) obtuvo resultados similares mediante la infección de *M. fijiensis* (cepa I1) sobre hojas separadas de diferentes cultivares de *Musa* spp. y establecidas en un medio de cultivo sólido de supervivencia.

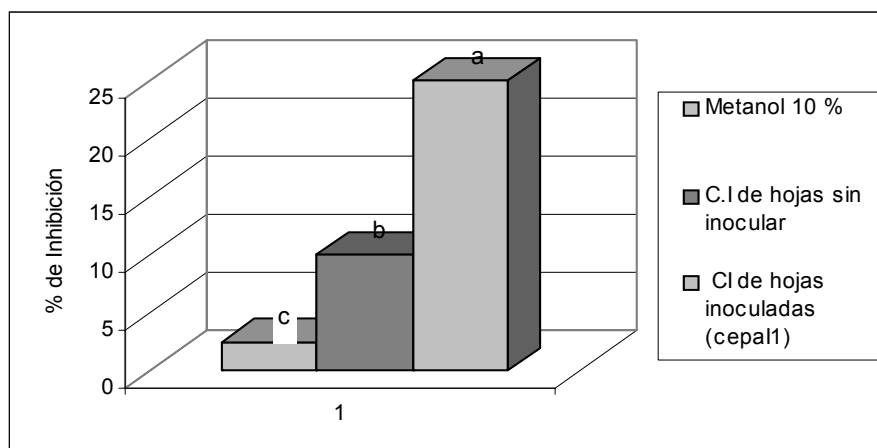
La técnica de aislamiento del contenido intercelular ha sido empleada para recuperar sustancias presentes en los espacios intercelulares del tejido foliar de varias especies de plantas sujetas a diversos factores estresantes (Laisk *et al.*, 1989, Luwe *et al.*, 1993). Riveros y Lepoivre (1994), detectaron la actividad de la enzima glucanasa en el fluido apoplástico de hojas de bananos inoculadas con *M. fijiensis*. Soledade *et al.* (1997), comprobaron la presencia de la fitoalexina Sinalexin inducida por la toxina Destruxin B producida por *Alternaria brassicae* en plantas de *Brassica napus*. Estudios similares han sido realizados en el patosistema Tomate-*Cladosporium fulvum* (Rosso *et al.*, 1999), Cebada-

Blumeria graminis f.sp. hordei (Kristensen et al., 2001) para estudiar los determinantes moleculares de la patogenidad y virulencia en esta interacción. Finalé et al. (2002) para analizar los niveles de expresión de los péptidos DmAMP1 (Dahlimerckii AMP) y RsAFP2 (*Raphanus sativus* AMP) en los fluidos intercelulares de plantas de bananos transformadas, empleó un procedimiento similar al utilizado en este trabajo, que le permitió detectar los mismos en plantas procedentes del cultivo *in vitro*.

Los resultados anteriores brindan la posibilidad de comparar diferentes aislados respecto a su patogenidad y virulencia en cultivares de *Musa* spp. con niveles de resistencia conocidos.

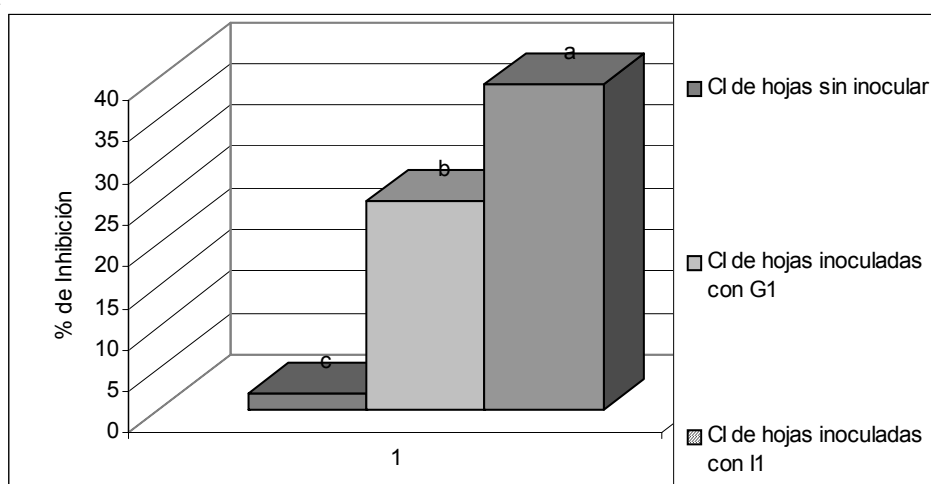
Ensayo b) Comparación del efecto de los contenidos intercelulares de hojas inoculadas con cepas de *M. fijiensis* que difieren en virulencia (cepa I1 y G1) sobre el transporte electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

Los extractos intercelulares de hojas del cultivar Grande naine (AAA) inoculadas con *M. fijiensis* (cepa I1 y cepa G1), inhibieron el intercambio electrónico en la suspensión de cloroplastos. La cepa I1 alcanzó el mayor porcentaje de inhibición, con valores superiores respecto al resto de los tratamientos. Al comparar los resultados entre las dos cepas se pudo apreciar que existieron diferencias estadísticas significativas entre las mismas y respecto al control (Figura 2).



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente para $P < 0.05$. Para la comparación de las medias se utilizó la prueba no paramétrica de Dunnnett's C.

Figura 1. Efecto de los extractos intercelulares de plantas inoculadas con *M. fijiensis* (cepas I1 y sin inocular) sobre el intercambio electrónico en cloroplastos aislados del cv Grande naine (AAA).



Medias con letras iguales no difieren estadísticamente para $P < 0.05$. Para la comparación de las medias se empleó la prueba no paramétrica de Dunnnett's C.

Figura 2. Efecto de los extractos intercelulares de hojas inoculadas con cepas de *M. fijiensis* que difieren en virulencia, sobre el intercambio electrónico en cloroplastos del cv Grande naine (AAA).

Los resultados de la inoculación en invernadero mostraron diferencias entre las cepas utilizadas en cuanto a la intensidad de la enfermedad. Los primeros

síntomas se observaron a los 12 días en hojas inoculadas con la cepa I1, mientras que en la cepa G1 aparecieron a los 16 días. Estos resultados se

corresponden con los períodos de incubación determinados por diversos autores en inoculaciones artificiales de *M. fijiensis* realizadas en condiciones similares (Mourichon *et al.*, 1987; Fouré *et al.*, 1990; Leiva, 1998).

Según se muestra en la figura 2 y en la figura 3, existió una correspondencia entre el efecto inhibitor del intercambio electrónico en la suspensión de cloroplastos y la intensidad de los síntomas de cada cepa.

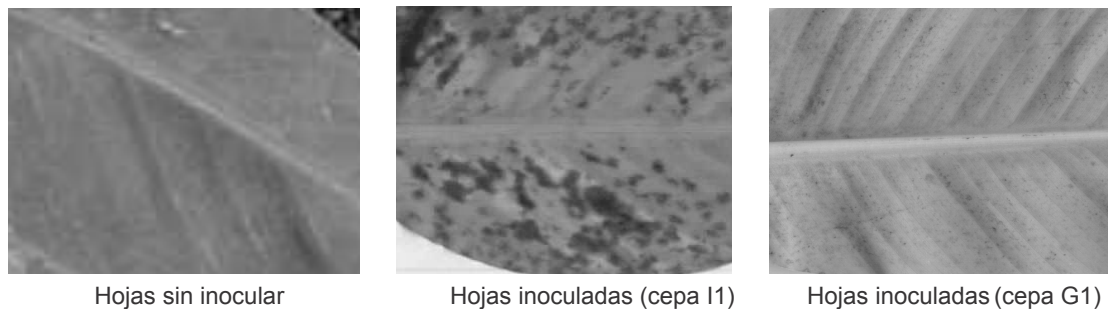


Figura 3. Desarrollo de los síntomas en plantas del cv Grande naine (AAA) después de 60 días de inoculadas con cepas de *M. fijiensis* de diferentes grados de virulencia (I1 y G1).

Estudios sobre la patogenicidad y la virulencia entre diferentes aislados, han sido utilizados para caracterizar poblaciones de varios agentes fitopatógenos. Bernal (2001), estudió la acción toxicogénica del filtrado de cultivo de diferentes aislados de *Alternaria solani* Sorauer y encontró diferencias con respecto a la actividad biológica de los mismos sobre hojas de diferentes cultivares de tomate. Nutsugah *et al.* (1994), emplearon tres aislados de *Alternaria tenuissima* y comprobaron mediante pruebas de inoculación artificial, que el aislado AT₅ fue más virulento que los restantes debido a la capacidad del mismo de producir mayor cantidad de toxinas. De igual forma, Kaur (1995), observó que la máxima producción de las toxinas "solanopirones" (A, B y C), estuvo correlacionada con el grado de patogenicidad de diversos aislados de *Ascochyta rabiei* sobre la especie *Cicer arietum*. Roussel *et al.* (1999), obtuvieron diferencias apreciables en el diámetro de las lesiones causadas por aislados compatibles e incompatibles de *Leptosphaeria maculans* sobre plantas de *Brassica napus*. Por otra parte, Michailides *et al.* (2001), encontraron una correlación entre la producción de toxinas por diferentes especies de *Alternaria* y la intensidad del atizonamiento foliar en plantas de *Pistachio*.

La inhibición diferencial entre los fluidos intercelulares de hojas inoculadas, correspondientes a las cepas I1 y G1 sobre el transporte electrónico de la suspensión de cloroplastos, indicó una desigual producción y acumulación en los espacios intercelulares de compuestos fitotóxicos producidos por ambas cepas de *Mycosphaerella fijiensis*. Balint-Kurti *et al.* (2001), al observar hifas de *M. fijiensis* y de *M. eumusae* transformadas con la proteína verde fluorescente (GFP) que sobrepasaron los límites de las áreas necróticas, demostraron la producción de fitotoxinas por ambos patógenos. Muchas de estas sustancias son utilizadas por el patógeno durante el proceso de colonización de los tejidos vegetales para sensibilizar los tejidos adyacentes al sitio de penetración y lograr una mayor

expansión de las lesiones foliares, por ello es importante disponer de bioensayos que permitan determinar la actividad de las toxinas difundidas por patógenos foliares en la fisiología de la planta enferma.

CONCLUSIONES

Se pudo evaluar las diferencias del efecto de los extractos intercelulares de plantas inoculadas con *M. fijiensis* (cepas I1 y G1) y sin inocular sobre el intercambio electrónico en cloroplastos aislados del cv. Grande naine.

REFERENCIAS

- Abbas, KH, Tanaka T y Shier T (1995) Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* A toxin (AAL-toxin) and fumonisin in Plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry* 40: 1681-1689
- Allen, EA, Hoch H C, Stadman J R, Stalvey R J (1991) Influence of leaf surface features on spore deposition and epiphytic grow of the phytopathogenic fungi. En: Andrews, J.H., (Eds). *Microbial of leaves*, pp 87-110 Springer-Verlag. Berlin
- Balint-Kurti, P J, May GD y Churchill A (2001) Development of a Transformation System for *Mycosphaerella* Pathogens of Banana: a toll for the study of host/pathogen interaction. *FEMS Microbiology Letters* 195: 9-15.
- Bernal, C, A (2001) Variabilidad cultural, patogénica y toxicogénica de aislamientos de *Alternaria solana* (Ellis y Martin) Jones y Grout en el cultivo del tomate. Tesis para optar por el título Académico de Master en Sanidad Vegetal. Universidad Agraria de la Habana.
- Busogoro, JP, JJ Etame G, Lognay PV, Cutsem y Lepoivre P (1999) Selection for banana resistance to Black Leaf Streak disease. *Infomusa* 8(2): 15.
- Cutsem (1999) Etude de leffect de substances toxiques produites par *Mycosphaerella fijiensis* agent causal de la cercosporiose, sur le fontionnement de chloroplastes de bananier. <http://www.fundp.ac.be/recherche/thematiques/fr/214.html> (consultada online el 12-12-01).
- Dyan, EF, Hernández A, Allen NS, Moraes MR, Vroman AJ, Avery AM y Duke OS (1999) Comparative phytotoxicity of artemisin

and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry*. 50: 607-614

Evidente, A, Caposso R, Cutignano A, Tagliatalata-Scafati O, Vurro M, Zonno, MC, Motta, A (1988) Ascaulitoxin, a phytotoxic Bis-amino acid N-glucoside from *Ascochyta caulina*. *Phytochemistry* 48: 1131-1137

Finalet, JA, Remy S, Francois I E, López J, Sagi L y Swennen R (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of Cuban Plantain cultivars for fungal tolerance. En: Jornada XXXV Aniversario INIVIT. Celebrado del 12-14 de Diciembre del 2002

Fouré, E, Mouliom P A y Mourichon X (1990) Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, au Camerun. Caracterisation de la resistance au champ de bananiers appartenant a deviers groups génétiques. *Fruit* 45 (4) : 339-345

Fullerton R A y T L Olsen (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 39-48

Harelimana, Lepoivre, P, Jijalkli H, Mourichon X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica* 96: 125-128

Hernández, NR (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* spp. para la evaluación de su respuesta a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). Tesis para optar por el título académico de Magister Scientiae. Centro agronómico tropical de la investigación y la enseñanza. Turrialba, Costa Rica

Khomoto, K, Sinhg U S, Sinhg R P (1995) Plant pathogenesis and host specificity in plant pathogenic fungi and nematodes. En: Kohmoto, K (eds) Pathogenesis and host specificity in plant disease. Vol II: Eukaryotes. 21-28. Pergamon, Oxford

Laisk, A, Kull O, Moldau H (1989) Ozone concentration in leaf intercellular spaces is close to zero. *Plant Physiology* 90:1163

Leiva, M M (1998) Estudios biológicos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, para el establecimiento de una metodología de selección en condiciones de invernadero. Tesis de Grado. UCLV

Llácer, G, López M M, Trapero A y Bello A (1996) Patología Vegetal. Cap 21. Interacciones Planta-hongo: mecanismo de infección, patogénesis y resistencia. Sociedad española de fitopatología. Ed Phytoma. 739-768

Luwe, M W F, Takahama U, Heber U (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101:969

Michailides, J. T., Pryor, B., Morgan, D., Felts, D (2001) The production of phytotoxins by *Alternaria* spp and the role of toxins in development of *Alternaria* late blight of pistachio.

University of California. Division of Agricultural Sciences. Department of Plant Pathology. Project year 2001.

Molina, G, Krausz, J (1989) Phytotoxic activity on crude extract from *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* and its use for evaluating resistance levels to Black Sigatoka. *Plant Diseases*. 73: 142-144

Mourichon, X, Peter D y Zapater M (1987) Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. *Fruits* 42: 195-198

Mourichon, X, Lepoivre P y Carlier J (2000) Host-pathogens interactions. Chapter 2 Fungal disease of the foliage. Pp 67-72 En: D.R. Jones, (ed.) Diseases of banana, abacá, and enset. CAB International

Nutsugah, S K (1994), Khomoto, K, Otani H, Kodama M y Sunkeswari, R.R (1993) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. *Journal of Phytopathology*. 140: 19-30

Okole, BN, Schulz FA (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross section of banana and plantain. *Plant Cell Report* 16: 339-343

Pino, A J, Navarro W, Salazar R, Valerin A (1996) Selección temprana de bananos y plátanos resistentes a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet mediante fitotoxinas. *Biología Aplicada* 13: 132

Riveros, A S y Lepoivre, P (1994) Early induction of non specific cultivar glucanase eliciting activity in the apoplastic fluids of banana infected by *Mycosphaerella fijiensis*. *Arch. Int. Physiol. Biophys* 102 (5) : 9-11

Roussel, S, Nicole M, López F, Ricii P, Geiger JP, Renard y Brun, MH (1999) *Leptosphaeria maculans* and cryptogin induce similar vascular responses in Tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Science* 144: 17-28

Soledade, M, Pedras C y Smith CK (1997) Sinalixin, a phytoalexin from white mustard elicited by destruxin B and *Alternaria brassicae*. *Phytochemistry* 46 (5). 833-837

Stierle, A, Upadhyay R, Hershenhorn J, Strobel G, Molina G (1991) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of banana and plantains. *Experientia* 47: 853-859

Triboush, SO, Danilenko NG y Davydenko OG (1998) A method for isolation of chloroplast DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 183-189

Upadhyay, R, Strobel, GA, Coval, S (1990) Some toxins of *Mycosphaerella fijiensis* En: Sigatoka leaf spot diseases of banana and plantain, pp 225-236. (INIBAP) San José

Walton, JD y Panaccione, DG (1993) Host selective toxins and disease specificity: Perspective and progress. *Annual Review of Phytopathology* 31: 275-303

Yoder, OC (1980) Toxins in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 18: 103-129