

Purificación de metabolitos fitotóxicos a partir del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gcv 01210 (raza 1)

Nayanci Portal^{1*}, Karlina García, Alitza Iglesias², Jenella Garraway¹, Barbarita Companioni², Luis Manuel Peña, Ramón Santos^{2*} * Autor para correspondencia

¹ Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Carretera a Morón km 1/2. Ciego de Ávila. e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu, nayansi@bioplantas.cu

² Centro de Bioplantas. UNICA. Carretera a Morón km 1/2. Ciego de Ávila.

³ Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida. Yucatán. México.

RESUMEN

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, está considerada como una enfermedad destructiva y de importancia económica en el género *Musa*. Los filtrados de cultivo del patógeno se han empleado para diferenciar cultivares, sin embargo no se han identificado metabolitos involucrados en la respuesta diferencial. El objetivo del presente trabajo fue purificar metabolitos fitotóxicos presentes en el filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] raza 1, para su posterior caracterización química. Se empleó un filtrado de cultivo de 15 días de incubación. La actividad fitotóxica se comprobó con un bioensayo de punteadura de hojas sobre el cultivar susceptible 'Gros Michel' y el resistente 'FHIA 01'. Se obtuvo y fraccionó el extracto orgánico. Se realizaron particiones con solventes orgánicos de polaridad ascendente y se comprobó la complejidad de cada una de las fracciones por Cromatografía en Capa Delgada. Los metabolitos se purificaron por Cromatografía en Columna Flash. Se lograron purificar dos compuestos a partir del filtrado de cultivo del patógeno que no sólo diferían en el color (azul y amarillo pálido), sino también en la polaridad. Las fracciones B (contenía compuesto azul) y E (contenía compuesto amarillo) produjeron diferencias significativas en el área de la lesión entre el cultivar susceptible y el resistente. Estos resultados no son concluyentes pero sientan las bases para la identificación de compuestos involucrados en la respuesta diferencial de cultivares de *Musa* spp. frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Palabras clave: actividad fitotóxica, cromatografía, extractos orgánicos, Mal de Panamá, plátanos y bananos

ABSTRACT

Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is considered a destructive disease of economic importance in the genus *Musa*. The culture filtrates of the pathogen have been used to differentiate cultivars, but have not been identified metabolites involved in the differential response. The aim of this study was to purify phytotoxic metabolites present in the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] Race 1 for further chemical characterization. We used a culture filtrate of 15 days of incubation. The phytotoxic activity was tested with a leaf bioassay on the susceptible cultivar 'Gros Michel' and resistant 'FHIA 01'. The organic extract was extracted and fractionated. It was partitioned with organic solvents of rising polarity and found the complexity of each of the fractions by TLC. The metabolites were purified by flash column chromatography. Two compounds were purified from the culture filtrate of the pathogen which not only differed in color (blue and pale yellow), but also in polarity. Fractions B (containing blue compound) and E (containing yellow compound) produced significant differences in lesion area between resistant and susceptible cultivar. These results are not conclusive but, it is the basis for the identification of compounds involved in the differential response of *Musa* spp. cultivars to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Key Words: phytotoxic activity, chromatography, organic extract, Panama disease, plantains and bananas

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) están entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropico (FAO, 2006; Martínez *et al.*, 2007).

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), representa la segunda enfermedad de importancia económica en el género *Musa* y se encuentra entre las diez enfermedades más importantes en la agricultura (Pérez- Vicente y Pocasangre, 2010).

Esta enfermedad entre 1890 y los primeros 50 años del siglo XX causó la destrucción de más de 40 000 ha del cultivar Gros Michel (*Musa* AAA) susceptible a la raza 1 del patógeno (Stover, 1962). El surgimiento de la Raza 4 de *Foc* (en cuarentena en Cuba), capaz de la causar enfermedad en cultivares del grupo 'Cavendish' (AAA) y en los cultivares resistentes a las razas 1 y 2, han promovido el temor de que el mercado mundial de bananos pueda afectarse nuevamente. Las pérdidas por la Raza 4 se han informado a partir de todas las regiones productoras del mundo, excepto las islas del sur del pacífico, Somalia y los países del mediterráneo (Pérez- Vicente y Pocasangre, 2010).

No existen variedades comerciales disponibles con resistencia a la enfermedad. Tampoco se cuenta con estrategias de control sostenibles fuera del reemplazo de variedades susceptibles por resistentes a la enfermedad. Los esfuerzos del mejoramiento genético convencional han tenido éxitos muy limitados, por el hecho de que los bananos 'Cavendish' son estériles y no producen semillas, por lo que la búsqueda de nuevos 'Cavendish' resistentes o tolerantes al Mal de Panamá continúa siendo una prioridad. Las estrategias no convencionales tales como transformación genética pudieran ser satisfactorias.

Fusarium oxysporum es un hongo necrotrófico. Las fitotoxinas, en este microorganismo juegan un papel fundamental para que ocurra la penetración en los tejidos vegetales, la colonización y el desarrollo de la enfermedad en plantas susceptibles.

Parece evidente que la clave del desarrollo sostenible de la producción del plátanos y bananos reside en el uso de variedades resistentes. Una importante vía lo constituye el uso de herramientas biotecnológicas desarrolladas a partir de estudios de la interacción hospedero-patógeno.

En estudios previos (Portal *et al.*, 2007) se logró obtener un filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] raza 1 (15 días de incubación) que logró diferenciar 14 cultivares de banano con diferentes grados de resistencia a la enfermedad en condiciones de campo. Sin embargo, no se han identificado metabolitos fitotóxicos presentes que pudieran estar relacionados con esta respuesta. Por ello, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de purificar metabolitos fitotóxicos presentes en filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] raza 1 para su posterior caracterización química y elucidación estructural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los cultivares de banano utilizados habían sido clasificados previamente en resistentes o susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] (raza 1) en el Banco de Germoplasma de Banano del Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT) por Rodríguez (2000) y Pérez *et al.* (2004). Las muestras foliares de banano se tomaron de plantas de ocho a nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma del INIVIT.

Cepa de Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (*Foc*).

La identificación de la raza y el grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) del aislado fue realizada por especialistas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Ciudad de La Habana.

Obtención de filtrados de cultivo (FC)

Se empleó un filtrado de cultivo obtenido a partir de la inoculación del hongo en el medio de cultivo líquido y 15 días de incubación según Portal *et al.* (2007) que se describe

brevemente. Para la obtención del FC se tomaron discos de micelio de 8 mm de diámetro próximos a la periferia de la colonia de *Foc* VCG [01210] crecidas en PDA, y se añadieron a razón de un disco por 100 ml de medio de cultivo Caldo Czapek con ligeras modificaciones [Glucosa (20 g), KCl (0.5 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g), NaNO_3 (2 g), H_2O destilada (1000 ml) a pH 5.5].

Los frascos se incubaron en condiciones estáticas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de luz solar. Se cosecharon ocho litros de FC. El medio de cultivo líquido se filtró a través de una capa de algodón y luego por papel de filtro Whatman No. 1. El sobrenadante se pasó a través de filtros con poros de 0.22 mm de diámetro (Sartorius) antes de ser usado en las pruebas biológicas y los análisis químicos.

Bioensayo de punteadura en hojas

Este bioensayo de punteadura de hojas (Companioni *et al.*, 2003) se seleccionó por su simplicidad y reproducibilidad. Las hojas de banano colectadas de plantas adultas, crecidas en campo en el INIVIT, fueron lavadas y enjuagadas con agua destilada estéril, luego fueron secadas con papel de filtro. Se realizaron incisiones con una aguja estéril en el limbo de las hojas (separadas a 3 cm entre ellas). Las heridas en las hojas fueron cubiertas con 5 μl del FC del hongo o sus fracciones. Las hojas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14 horas y 70% de humedad relativa por 48 horas.

Transcurrido el tiempo se determinó el Área de la lesión elíptica inducida. El medio de cultivo líquido sin inocular con el hongo, pero incubado y concentrado en similares condiciones que el FC se usó como control. Cada tratamiento contó con tres hojas de cada cultivar y se realizaron 16 heridas por muestra.

Procesamiento estadístico

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versión 11.5, Copyright SPSS Inc., 1989-1997). En la generalidad de los experimentos se realizaron pruebas paramétricas: Análisis univariante, Anova de un factor, ANOVA y HSD de Tukey. La probabilidad máxima de cometer error de tipo I fue 0.05.

Obtención y fraccionamiento del extracto orgánico a partir del FC

Se cosecharon ocho litros del filtrado del cultivo de 15 días de incubación. Después de filtrado por papel de filtro se extrajo con Acetato de Etilo tres veces en una relación 1:1 (Figura 1), en agitación por una hora. Las fracciones de Acetato de Etilo obtenidas de cada extracción se concentraron hasta sequedad.

Para realizar el fraccionamiento del FC cada muestra se disolvió en el menor volumen posible de agua:metanol (9:1, v/v). Se realizaron particiones con solventes orgánicos de polaridad ascendente: Hexano, Acetato de Etilo y Butanol (Figura 2) y se comprobó la complejidad de cada una de las fracciones obtenidas (1A, 1B, 1C) por Cromatografía en Capa Delgada.

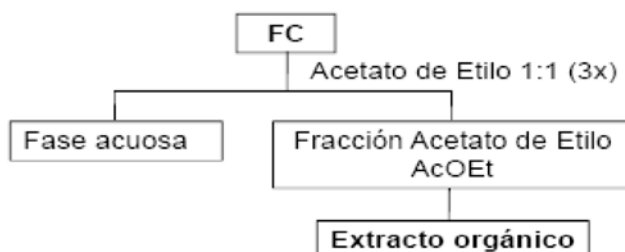


Figura 1. Diagrama de flujo para la obtención de extractos orgánicos a partir del filtrado de cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] de 15 días de cultivo.

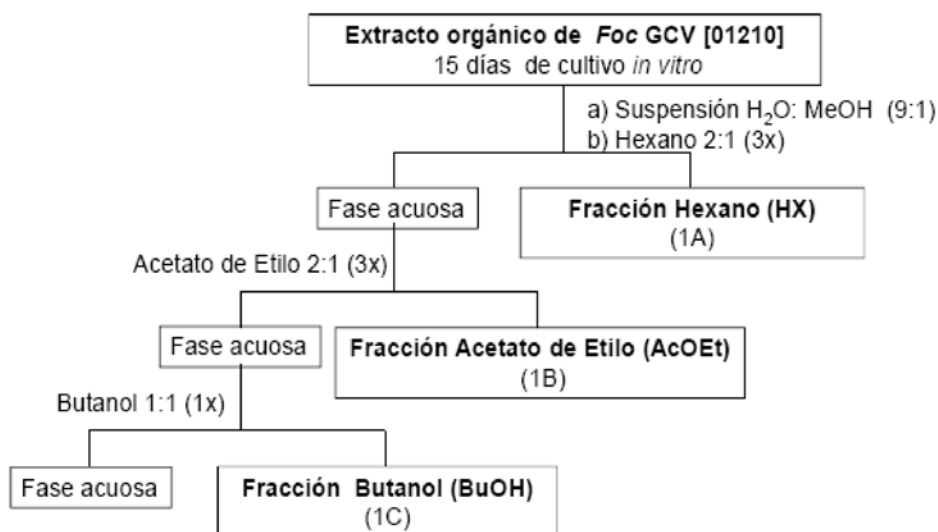


Figura 2. Diagrama de flujo para la partición con solventes orgánicos del extracto orgánico obtenido del filtrado de cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] a los 15 días de crecimiento en medio de cultivo líquido.

Cromatografía analítica en capa delgada (CCD)

Las fracciones se disolvieron en MeOH:CH₂Cl₂ hasta obtener una concentración final de las muestras del 1%, y se aplicaron en placas de aluminio para CCD (Merck, sílica gel 60, espesor 0.2 mm) con un capilar fino.

Se emplearon varios solventes de elución: Diclorometano (CH₂Cl₂): Acetona (An) (9:1), Hexano (Hx): Acetona (An) (8:2), Hexano (Hx): An (9:1), Hexano (Hx): An (99:1), Hexano (Hx): An (95:5), Hexano (Hx): An (5:5), Cloroformo (CHCl₃) (100), Cloroformo (CHCl₃): Metanol (MeOH) (98:2), Cloroformo (CHCl₃): Metanol (MeOH) (9:1), Cloroformo (CHCl₃): Metanol (MeOH) (6:3), CHCl₃: MeOH: Agua (14:7:1), Acetato de Etilo (AcEt): Acetona (An): Agua (25:20:2).

Las placas cromatográficas se revelaron en una solución de ácido fosfomolibdico (20g) y sulfato cérico (2.5g) en ácido sulfúrico al 5%.

Las placas se secaron con papel absorbente y se calentaron en una parrilla de calentamiento. Se usó como control el extracto orgánico del FC de *Foc* GCV [01210].

*Fitotoxicidad de fracciones parcialmente purificadas del extracto orgánico de *Foc**

Las fracciones se pesaron y resuspendieron en una solución de 10 ml Metanol (MeOH)/90 ml de agua (H₂O) para obtener una concentración final de 1 mg ml⁻¹. Para el Bioensayo se siguieron los procedimientos descritos anteriormente.

Purificación por Cromatografía en Columna Flash de fracciones obtenidas por la partición del extracto orgánico de *Foc*

Se unieron las fracciones Hexano (1A) y Acetato de Etilo (1B) obtenidas de la partición con solventes orgánicos del FC de *Foc* GCV [01210] y se disolvieron con diclorometano. La muestra se pasó por una columna de 20 mm de diámetro, a la cual se le añadió gel de sílice 200-400 mesh hasta una altura de 20 cm. Para preparar la cabeza se utilizó sílice de 70-230 con la muestra adsorbida. Los solventes para realizar las corridas cromatográficas fueron Hx:An (95:5) y CHCl₃:MeOH (6:3), acorde a los resultados previamente obtenidos. A la columna se le aplicó aire a un flujo de ½ pulgada en 15 segundos. Se

recolectaron fracciones de 10 ml que se unieron teniendo en cuenta la elucidación y visualización por CCD con los solventes de elución: Hx:An (9:1) y CHCl₃:MeOH (6:3).

Fitotoxicidad de fracciones purificadas por Cromatografía en Columna Flash de Foc

Las fracciones obtenidas por Cromatografía Flash (A, B, C, D y E) se pesaron y resuspendieron en una solución de 10 ml Metanol (MeOH)/90 ml de agua (H₂O) para obtener una concentración final de 0.05 mg ml⁻¹. Para el bioensayo se siguieron los procedimientos descritos anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Obtención y fraccionamiento del extracto orgánico a partir del FC de Foc

Los rendimientos de las fracciones obtenidas por la partición con solventes orgánicos del extracto del FC de Foc, se muestran en la tabla 1. El rendimiento total fue de 1.7116 g (0.21395 g l⁻¹). Se evidenció la presencia de un compuesto soluble en agua que estaba adherido a las paredes del matraz. En la figura 3 se observan los resultados de las CCD de las fracciones obtenidas de la partición con diferentes solventes orgánicos del extracto del filtrado de cultivo de Foc GCV 01210.

Tabla 1. Rendimiento de las fracciones obtenidas por el fraccionamiento del extractos orgánicos de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] día 15.

Fracción	Rendimiento (g)
Extracto orgánico	1.7116
Fracción Hexano (1A)	0.1477
Fracción Acetato de Etilo (1B)	0.5657
Fracción Butanol (1C)	0.4425
Total	1.1559

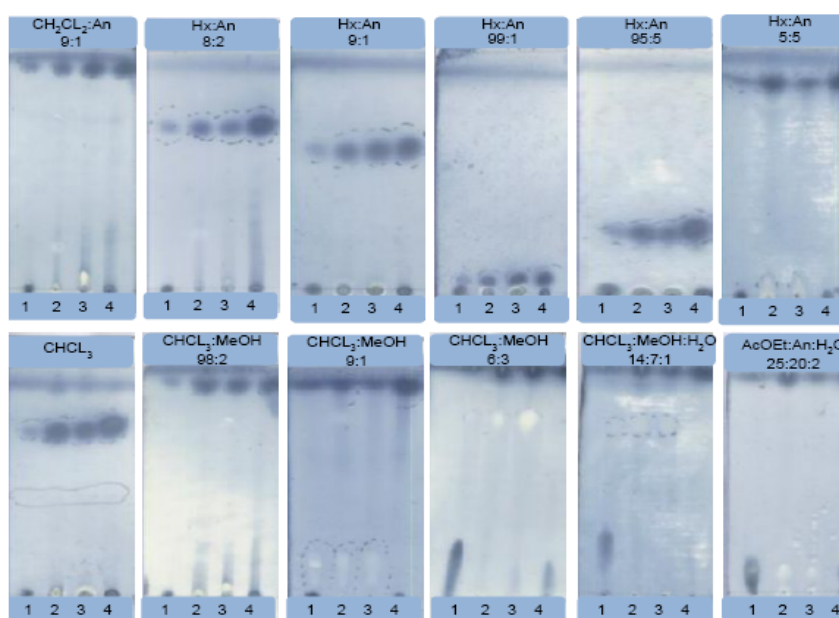


Figura 3. Cromatografía en Capa Delgada de las fracciones obtenidas por la partición con solventes orgánicos del extracto del filtrado de cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* GCV 01210 (R1-15). 1) Extracto orgánico, 2) Fracción Hexano (1A), 3) Fracción Acetato de Etilo (1B), 4) Fracción Butanol (1C)).

En el análisis de las placas se observaron dos tipos de compuestos que no sólo diferían en el color (azul y amarillo pálido), sino también en la polaridad. Los compuestos de color azul se observaron en todas las fracciones, mientras que los de color amarillo pálido no se observaron en la fracción butanol, por lo que se decidió reunir la fracción de hexano con la de acetato de etilo.

Teniendo en cuenta el perfil cromatográfico, los eluyentes con los que se obtuvo una mejor resolución resultaron ser: Hexano:Acetona (8:2; 9:1; 95:5) Cloroformo (100%) y Cloroformo:Metanol (6:3).

Fitotoxicidad de fracciones parcialmente purificadas del extracto orgánico de Foc

En la figura 4 se muestra la actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas y del extracto orgánico de *Foc* GCV [01210]. Solo se observó actividad fitotóxica con el extracto orgánico y con la fracción en acetato de etilo.

Con el extracto orgánico se obtuvo mayor actividad fitotóxica sobre el cultivar resistente, lo que pudo ser debido a la exclusión en la fase acuosa de uno o varios compuestos involucrados en el reconocimiento del patógeno, y posterior desencadenamiento de la respuesta defensiva *in vivo*, que dada su polaridad no se haya extraído con el Acetato de Etilo. Se reconocen tres modelos para el reconocimiento del patógeno y la inducción

de mecanismos defensivos en plantas, todos los cuales involucran proteínas de avirulencia secretadas por los patógenos (Dodds *et al.*, 2006; van der Hoorn y Kamoun, 2008).

En el segundo caso, la carencia de fitotoxicidad sobre el cultivar susceptible, pudo estar asociada a la dilución empleada en la concentración de la fase AcOEt.

Purificación por Cromatografía en Columna Flash las fracciones obtenidas por la partición del extracto orgánico de Foc

En la figura 5 se observan las CCD de las fracciones obtenidas de la purificación por Columna Flash de las fracciones 1A y 1B. En ellas se observó la presencia de un compuesto aparentemente puro de color azul, que se encontró en las fracciones 3-7 y otro de color amarillo en las fracciones 35-40. Las fracciones se reunieron teniendo en cuenta estos resultados en: A (1-2), B (3-8), C (9-14), D (15-34) y E (35-40).

Chakravarthi *et al.* (2008) identificaron Paclitaxel, un compuesto diterpeno a partir del cultivo en medio líquido de *Fusarium solani* aislado de *Taxus celebica*. El compuesto fue identificado basado en CCD y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), así como análisis espectral por Ultravioleta (UV),

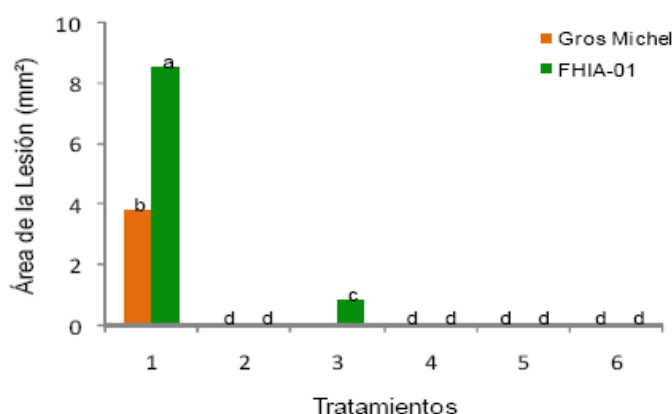


Figura 4. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas por el fraccionamiento del extracto orgánico de *Foc* GCV [01210] (raza 1). Tratamientos: 1) Extracto Orgánico (10mg/mL); 2) Fracción Hexano (10mg ml⁻¹); 3) Fracción Acetato del Etilo (10mg ml⁻¹); 4) Fracción Butanol (10mg ml⁻¹); 5) Fracción Acuosa (10mg ml⁻¹); 6) Control negativo (10ml MeOH/90ml H₂O). Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, HSD de Tukey, p<0.05)

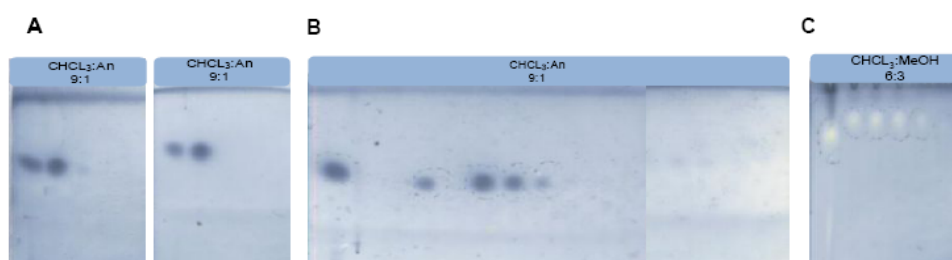


Figura 5. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) de las fracciones obtenidas por la purificación por cromatografía en columna Flash de las fracciones Hexano y Acetato de Etilo de *Foc* GCV 01210 (R1-15). A y B) Eluyente utilizado para la columna Flash: Hx:An (95:5), C) Eluyente para la columna Flash CHCl₃:MeOH (6:3). (En los puntos de aplicación c: Extracto orgánico sin purificar (control), 1-40 fracciones recolectadas en la cromatografía por columna Flash).

Matriz de Desorción/Ionización Asistida por Laser (MALDIS-MS) y Espectro de Masa en Cromatografía Líquida-Electrospray Ionización (LC-ESI-MS).

Fitotoxicidad de fracciones purificadas por Cromatografía en Columna Flash de Foc

La actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas por la purificación por columna Flash

de las fracciones Hexano (1A) y Acetato de Etilo (1B) se muestran en la figura 6. Se observó actividad fitotóxica en las muestra: Extracto orgánico, Fracción A y Fracción E. Las fracciones B (contenía compuesto azul) y E (contenía compuesto amarillo) produjeron diferencias significativas en el área de la lesión entre el cultivar susceptible y el resistente. Esta última (E) mostró mayor actividad biológica.

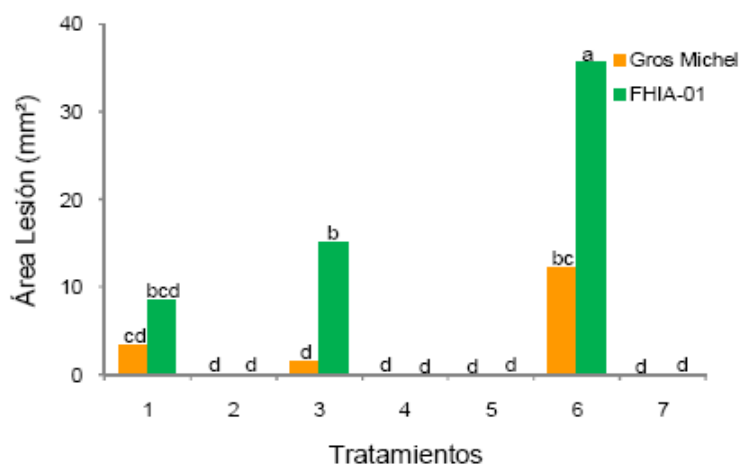


Figura 6. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas por la purificación por Columna Flash de las fracciones 1A (Hx) y 1B (AcOEt), obtenidas por el fraccionamiento del extracto orgánico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] (raza 1), frente al cultivar susceptible 'Gros Michel' y resistente 'FHIA- 01'. Tratamientos: 1) Extracto Orgánico (0.05mg ml⁻¹); 2) Fracción A (0.05mg.ml⁻¹); 3) Fracción B (0.05mg ml⁻¹); 4) Fracción C (0.05mg ml⁻¹); 5) Fracción D (0.05mg ml⁻¹); 6) Fracción E (0.05mg ml⁻¹) y 7) Control negativo (10ml MeOH/90ml H₂O). Medias con letras iguales no difieren significativamente (ANOVA de un factor, HSD de Tukey, p<0.05)

CONCLUSIONES

Se purificaron dos compuestos a partir del FC de *Foc* GCV [01210] raza 1. Estos resultados no son concluyentes pero sientan las bases para la identificación de compuestos involucrados en la respuesta diferencial de cultivares de *Musa* spp. frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

REFERENCIAS

- Companioni B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez M C, Borrás O, Lorenzo JC, Santos R (2003) Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non-destructive *in vitro* differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. *Euphytica* 130:341-347
- Chakravarthi BVSK, Das, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C (2008) Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *J. Biosci.* 33: 259-267
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CIA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Pro. Natl Acad. Sci. USA* 103, 8888-8893
- FAO (2006) Banano, notas sobre productos básicos: situación del mercado en 2005 y comienzos de 2006. En línea: <http://www.fao.org> (consultado en enero 2008).
- Martínez G, Delgado E, Pargas R, Manzanilla E, Ramírez H (2007) Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. I: Producción, exportación e importación. CENIAPHOY. No. 13 enero-abril. En línea: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/index.htm>
- Pérez L (2004) *Fusarium* wilt (Panamá disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004. San José.
- Pérez- Vicente L, Pocasangre LE (2010) Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y El Caribe. Taller de entrenamiento sobre diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá.
- Portal N, Companioni B, Achade C, Mvila B, Arzola M, Persaud I, Acosta M, Sánchez C, Leiva M, Roque B, Alvarado Y, Santos B (2007) Evaluación de la actividad fitotóxica sobre plantas de *Musa* spp. y contenido de proteínas totales en filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. *Biotecnología Vegetal* 7(3): 181-186
- Rodríguez S (2000) Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca, plátanos y bananos resistentes, tolerantes a los factores adversos a la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final del proyecto 00200091. INIVIT.
- Stover R H (1962) Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. *Phytopathol. Pap.* 4. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. Pp. 117.
- Sun ES, Su HJ (1984) Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets. *Trop. Agric.* 61: 7-8
- Van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* (20): 2009-2017