

## Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*

Cynthia Sánchez-García\*, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín, Mayra Acosta-Suárez, Michel Leiva-Mora, Berkis Roque \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: cyn@ibp.co.cu

### RESUMEN

Aún es muy limitado el conocimiento de los eventos bioquímicos involucrados en la interacción tanto compatible como incompatible en el patosistema *Musa-M. fijiensis*, por ello, el empleo de herramientas que permitan el estudio de los mecanismos de defensa de la planta ante el patógeno, de manera rápida y sencilla, resulta muy necesario. Es por esta razón que el objetivo de este trabajo fue detectar compuestos bioquímicos relacionados en hojas de plantas de *Musa* sp. inoculadas con *M. fijiensis*. Para esto, se emplearon técnicas histoquímica para la visualización de lignina, peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos en los diferentes estados de síntoma de la enfermedad. Se emplearon plantas de los genotipos de *Musa acuminata*: 'Grande naine' (susceptible) y 'Calcutta 4' (resistente). Como resultado, se observó la presencia de deposiciones de lignina, así como la acumulación de peróxido de hidrógeno y fenoles en el tejido vegetal correspondiente a los diferentes síntomas de la enfermedad, tanto en las plantas del genotipo susceptible como del resistente. La presencia de estos compuestos aumentó a medida que evolucionaron los síntomas en ambos, y en el caso de la acumulación de peróxido de hidrógeno esta fue mayor en plantas de 'Calcutta 4' respecto a las de 'Grande naine'. Se demostró que mediante técnicas histoquímicas se pudo observar la acumulación de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta de defensa de la planta ante la infección del patógeno. Estos resultados, además, ofrecen nuevas evidencias de los mecanismos de defensa de la planta en la interacción *Musa-M. fijiensis*.

Palabras clave: compuestos fenólicos, lignina, peróxido de hidrógeno, Sigatoka negra

### ABSTRACT

Knowledge about biochemical events involved in both compatible and incompatible interaction in *Musa-M. fijiensis* pathosystem it is still very limited. Then, the use of tools to study fast and simply plant defence mechanisms against the pathogen is very necessary. The aim of this study was to detect defence related compounds in leaves of *Musa* sp. plants inoculated with *M. fijiensis*, using histochemical techniques. Histochemical techniques were used to visualize lignin, hydrogen peroxide and phenolic compounds in different states of symptoms in *Musa acuminata* genotypes: 'Grande naine' (susceptible) and 'Calcutta 4' (resistant). It was observed the presence of lignin deposition and accumulation of hydrogen peroxide and phenolics in plant tissue in all the disease symptoms either in susceptible or resistant genotypes. The presence of these compounds increased with the development of symptoms. The accumulation of hydrogen peroxide was greater in 'Calcutta 4' plants compared to 'Grande naine'. Results showed that using histochemical techniques, the accumulation of some biochemical compounds related to plant defence response against pathogen infection could be observed. These results provide further evidences of the mechanisms of plant defence in *Musa-M. fijiensis* interaction.

Key words: Black sigatoka, hydrogen peroxide, lignin, phenolics

### INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los mecanismos involucrados en la interacción *Musa-Mycosphaerella fijiensis* resulta de gran interés con el fin de aportar nuevos genes

para los programas de mejoramiento genético. Es por esto que se han realizado varios estudios a nivel genómico en este patosistema. Por ejemplo, en *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides* 'Calcutta 4' (Vilarinhos *et al.*, 2003), en *Musa*

*balbiana* 'Pisang Klutuk Wulung' (Šafá *et al.*, 2004) y en *Musa acuminata* 'Tuu' (Ortiz *et al.*, 2005). De igual forma, Portal (2008) identificó varios genes involucrados en la respuesta defensiva de *Musa* spp. ante *M. fijiensis*, en plantas del cultivar 'Grande naine' (AAA).

Adicionalmente, se han desarrollado varias técnicas para el estudio de este patosistema como la transformación de *Mycosphaerella* sp. con un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP, de sus siglas en inglés: *Green Fluorescent Protein*), lo cual constituye una herramienta importante para el estudio de la interacción planta-patógeno (Balint-Kurti *et al.*, 2001). Además, se han estandarizado técnicas de transformación con lo cual se han obtenido plantas de banano que contienen genes antifúngicos (Gómez Lim *et al.*, 2002).

No obstante, aunque se ha avanzado en el estudio a nivel genómico, el conocimiento de los eventos bioquímicos involucrados en la interacción tanto compatible como incompatible en el patosistema *Musa-M.fijiensis* aun es limitado e insuficiente. Es por esto, que resulta necesario su estudio a otros niveles, con el fin de lograr un entendimiento global de esta interacción. En este sentido la aplicación de técnicas rápidas y sencillas que faciliten dicho estudio resulta imprescindible.

Se ha demostrado que con el empleo de técnicas histoquímicas, en varios patosistemas, que la infección inicial del hongo en el tejido vegetal induce numerosos cambios estructurales y fisiológicos en las células que rodean el sitio de penetración del patógeno, para restringir su avance y además, reducir la pérdida de líquidos (Ferreira *et al.*, 2007).

Mediante el uso de estas técnicas se ha observado, además, que las primeras capas de células más cercanas al patógeno se modifican a través de la acumulación de sustancias impermeables y antimicrobianas como suberina, lignina, polifenoles y otros (Eyles y Mohammed, 2002). Sin embargo, la evidencia de estos mecanismos de defensa en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* aún se desconoce. Por esta razón, el objetivo del

presente trabajo fue detectar compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *M. fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) y 'Calcutta 4' (*Musa* AA) propagadas *in vitro* vía organogénesis según el protocolo descrito por Orellana (1994).

El material vegetal para el establecimiento *in vitro* de 'Grande naine' provino de la empresa 'La Cuba', Ciego de Ávila y para 'Calcutta 4' del Banco de Germoplasma del INIBAP (ITC 0249, Bélgica).

Las plantas se sembraron en bolsas de polietileno con sustrato compuesto por 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita y se mantuvieron en fase de aclimatización durante 45 días. Posteriormente, se transfirieron a macetas plásticas de 20 cm de diámetro con un litro de capacidad, con igual sustrato por 45 días (en el período de junio-julio) hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y tres hojas completamente abiertas.

Las plantas se colocaron en una casa de cultivo con luz solar, con una media en la intensidad luminosa de 3 841  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$  (medido con Extech Light Meter 401025, USA) y riego tres veces al día.

### Evaluación del desarrollo y evolución de los síntomas

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis* así como el proceso de inoculación artificial se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Alvarado *et al.* (2003). Se empleó la cepa CCIBP-Pf83 de *M. fijiensis* procedente de la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba.

Para cada genotipo, se inocularon las tres primeras hojas de diez plantas con una suspensión micelial del hongo e igual número de plantas con gelatina al 1% (m/v), las

cuales se usaron como controles. Las plantas se ubicaron en la casa de cultivo completamente al azar.

Las plantas se observaron cada tres días para describir la evolución de los síntomas a partir del día tres después de la inoculación (dpi). La evaluación cualitativa de los síntomas, en las tres hojas inoculadas por planta, se realizó según la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003).

Se determinó el período de incubación definido como el número de días desde el momento de la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas (Molina y Castaño, 2003) y el tiempo de evolución de los síntomas definido como la duración en días de la evolución de los síntomas desde el estado 1 al 6 propuestos por Fouré (1985) (Hernández y Pérez, 2001).

#### **Detección de compuestos bioquímicos en los diferentes estados de síntoma**

Para el análisis histoquímico se colectaron al azar tres lesiones por estado de síntoma de tres plantas inoculadas, para un total de nueve lesiones por estado de síntoma, de ambos genotipos. Se colectaron además, igual número de fragmentos de tejido sin síntomas de plantas controles.

#### *Deposiciones de lignina*

Las deposiciones de lignina en las paredes celulares se visualizaron mediante una tinción con solución de fluoroglucina al 1% (m/v) en etanol al 70% (v/v), durante 5 minutos (Southerton y Deverall, 1990). Posteriormente, se adicionaron dos gotas de ácido clorhídrico (HCl) al 36%, se enjuagó, se colocó un cubreobjeto y se observó en un microscopio Olympus (400x). Ante la presencia de lignina se observan áreas de color rojo/rosado (Gahan, 1984). Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente.

#### *Acumulación de peróxido de hidrógeno*

Las muestras se sumergieron durante 30 min en una solución de 1 mg.ml<sup>-1</sup> de 3,3' diaminobenzidina en HCl, pH 4, con el fin de detectar la presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en el tejido vegetal (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) y se observaron a través de un

microscopio óptico (400x). La diaminobenzidina se polimeriza y forma un color marrón intenso como producto de la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de la enzima peroxidasa. Esta pigmentación se observa al remover la clorofila del tejido vegetal hirviéndolo en una solución de etanol al 95% (v/v), durante 5 min. Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente.

#### *Acumulación de compuestos fenólicos*

Para la detección de compuestos fenólicos se empleó el método colorimétrico descrito por Reeve (1951). Se agregó una gota de nitrato de sodio al 10% (v/v), una gota de ácido acético al 10% (v/v) y luego una gota de urea al 20% (m/v). Después de 3 min, se adicionaron dos gotas de NaOH 2N. Los fragmentos vegetales se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos, para ser observados al microscopio óptico (200x). En presencia de los compuestos fenólicos se observa una coloración roja intensa. Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Evaluación del desarrollo y evolución de los síntomas**

El período de incubación en plantas infectadas de 'Grande naine' fue de 14 días, mientras que en plantas infectadas de 'Calcutta 4' fue de siete días aproximadamente. En plantas inoculadas del cultivar susceptible 'Grande naine' se observó la evolución completa de los síntomas desde el estado 1 hasta el 5. El tiempo de evolución de estos fue de 52 días, lo que coincide con los resultados descritos por Alvarado *et al.* (2003) y Leiva-Mora (2008) en dicho cultivar, bajo condiciones experimentales similares. En el genotipo resistente 'Calcutta 4' se observaron síntomas que solo evolucionaron hasta el estado 3 de la enfermedad. Resultados similares fueron descritos por Leiva-Mora (2008) en el genotipo parcialmente resistente 'Yangambi km5', en condiciones similares.

En las plantas inoculadas de 'Grande naine' se observó la presencia de lesiones puntiformes de color pardo-rojizo por la parte abaxial de las hojas alrededor de los 14 dpi (estado 1) (Figura 1Aa). Estas evolucionaron hacia la

formación de manchas de contornos irregulares de coloración pardo-rojizo alrededor de los 21 dpi (estado 2) (Figura 1Ab), los cuales fueron visibles por la parte adaxial de las hojas (Figura 1Ac) a los 30 dpi aproximadamente (estado 3). A partir de los 38 dpi se observaron manchas negras con bordes cloróticos y halos acuosos (estado 4) (Figura 1Ad). Posteriormente, al cabo de los 52 dpi, se observó la presencia de manchas grises circulares o elípticas con centros secos (Figura 1Ae), las cuales en su mayoría, se unieron y formaron manchas necróticas (estado 5). La evolución de los síntomas en el genotipo 'Grande naine' así como sus características coincidieron con lo descrito por Leiva-Mora (2008) en dicho cultivar bajo condiciones similares.

En plantas inoculadas de 'Calcutta 4' los primeros síntomas se observaron a los 7 dpi (Figura 1Ba) y estos presentaron las mismas características observadas en las plantas inoculadas de 'Grande naine', igualmente ocurrió con los síntomas en estado 2, los cuales se observaron alrededor de los 14 dpi (Figura 1B b) y con los síntomas en estado 3, los cuales se observaron a los 21 dpi (Figura 1B c).

#### Detección de compuestos bioquímicos en los diferentes estados de síntoma

#### Deposiciones de lignina

Se observó la presencia de deposiciones de lignina en las paredes de las células cercanas al posible sitio de penetración del patógeno en ambos genotipos, solo en el tejido vegetal con síntomas.

Tanto en el genotipo susceptible como en el resistente, en los primeros estados de síntomas las deposiciones de lignina se presentaron de forma más localizada, mientras que a medida que dichos estados de síntomas evolucionaron, estas aumentaron gradualmente involucrando un mayor número de células dañadas, lo que estuvo en correspondencia con la evolución de los síntomas observada macroscópicamente (Figura 2A y B).

Al respecto, autores como Smith *et al.* (2007) mediante la aplicación de técnicas de histoquímica observaron que en lesiones de plantas de *Eucalyptus globulus* (Labill) (susceptible) y *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) (resistente), infectadas naturalmente con *Mycosphaerella* spp., ocurrieron deposiciones de lignina en las paredes celulares, las cuales se incrementaron a medida que evolucionaron los síntomas y fueron mayores en el genotipo resistente.

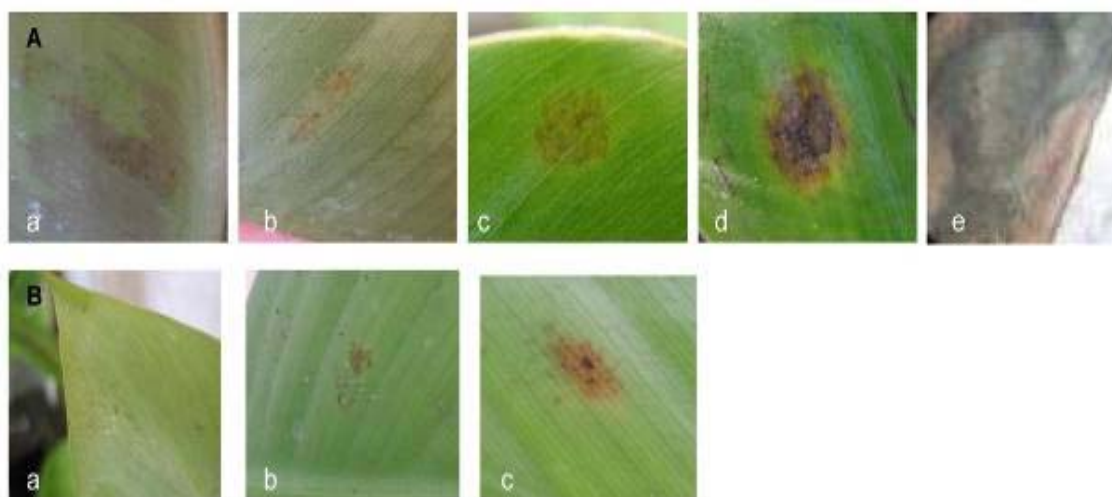


Figura 1. Síntomas en hojas de plantas de A) 'Grande naine' y B) 'Calcutta 4' en diferentes estados, causados por la inoculación artificial de *M. fijiensis*., en casa de cultivo. (a) Lesiones puntiformes rojizas (estado 1), (b) manchas con contornos irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte abaxial de la hoja (estado 2), (c) manchas con contornos irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte adaxial de la hoja (estado 3) y (d) mancha negra con borde clorótico y halo acuoso (estado 4) y (e) mancha negra con centro gris seco (estado 5)

Igualmente, mediante la aplicación de estas técnicas ha sido observada la acumulación de lignina y compuestos fenólicos y se ha relacionado su presencia con la resistencia a enfermedades en patosistemas tales como: *Triticum aestivum*-*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Beardmore *et al.*, 1983), *Solanum lycopersicum*-*Verticillium alboatrum* (Robb *et al.*, 1987) y *Oryza sativa*-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Reimers y Leach, 1991). Estos autores observaron deposiciones de lignina en el tejido de plantas infectadas como respuesta al ataque del patógeno y en algunos casos se observó que fueron mayores en las plantas con resistencia al patógeno, respecto a las susceptibles.

Se ha demostrado en otros patosistemas, que después que ocurre la infección por parte del patógeno la planta responde rápidamente mediante la acumulación de fitoalexinas en el sitio de penetración y produce lignina y otros productos con el fin de frenar su expansión. Esto evidencia el papel de la lignificación de las células en el incremento de la resistencia en la planta frente al ataque fúngico (Ferreira *et al.*, 2007).

En este sentido, existen varios informes en plantas de cereales tratadas con enzimas inhibitoras de la formación de lignina, en las cuales se favoreció la penetración del patógeno en el tejido vegetal (Zeyen *et al.*, 1995). Igualmente, se ha planteado que la lignina juega un papel importante en el mecanismo de respuesta hipersensible (HR). En plantas de *Hordeum vulgare*, *Triticum* spp. y *Avena sativa* tratadas con inhibidores de precursores de la lignina, la HR se suprimió y la infección del patógeno fue exitosa (Zeyen *et al.*, 1995; Khurana *et al.*, 2005; Vianello *et al.*, 2007).

#### Acumulación de peróxido de hidrógeno

Se observó la acumulación de peróxido de hidrógeno en los tejidos de hojas analizadas, tanto en el genotipo susceptible como en el resistente en los fragmentos foliares correspondientes a todos los estados correspondientes a todos los estados de síntomas, la cual aumentó a medida que estos evolucionaron (Figuras 3A y B). Sin embargo, no se observó acumulación de peróxido en el tejido sin síntomas analizado.

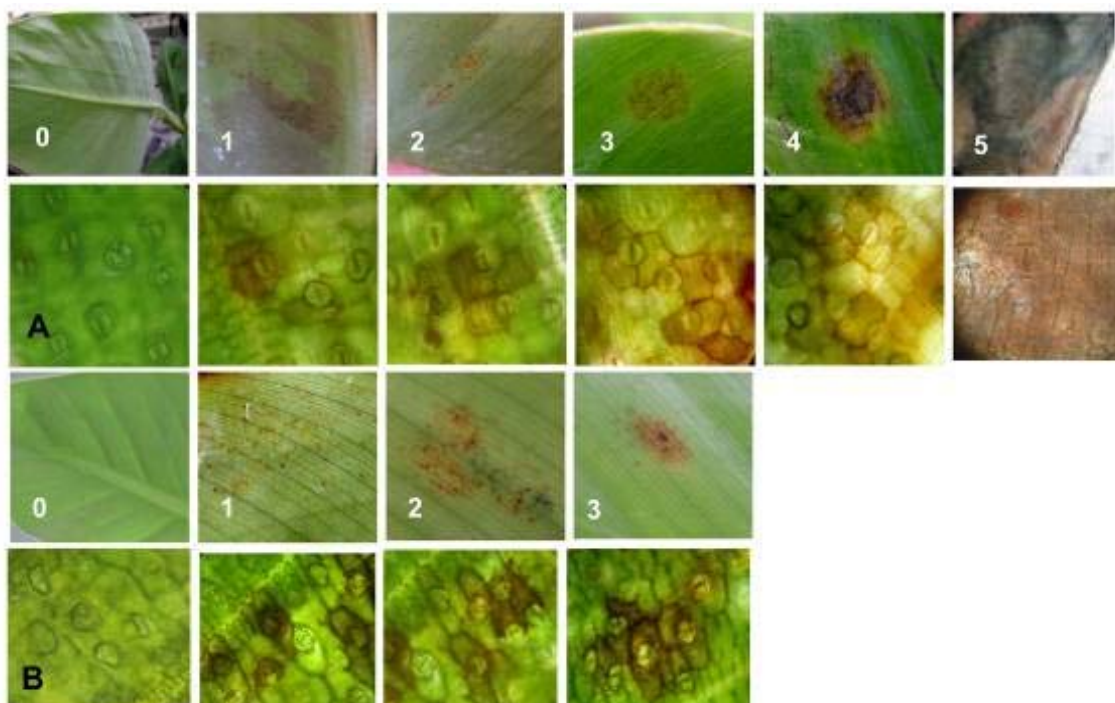


Figura 2. Depositiones de lignina en las paredes celulares en hojas de plantas inoculadas con *M. fijiensis*, de A) 'Grande naine', en tejido sin síntomas (0) y en diferentes estados de síntomas (1-5) y de B) 'Calcutta 4', en tejido sin síntomas (0) y en diferentes estados de síntomas (1-3), (400 x)

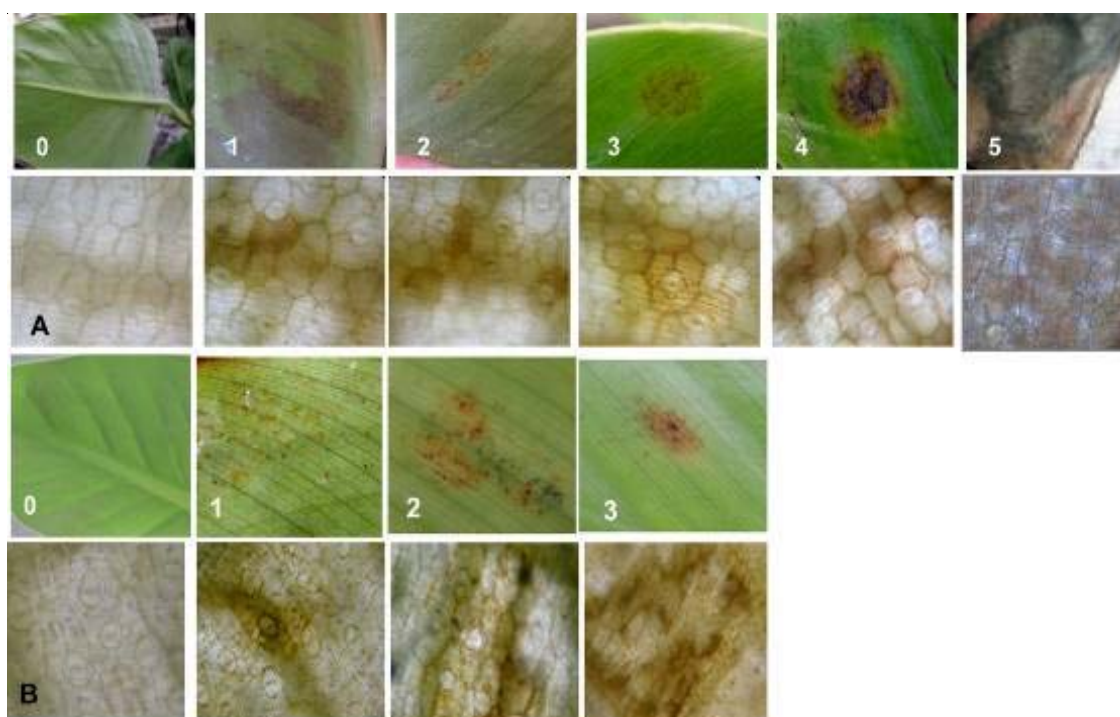


Figura 3. Acumulación de peróxido de hidrógeno en hojas de plantas inoculadas con *M. fijiensis*, de A) 'Grande naine', en tejido sin inocular (0) y en diferentes estados de síntomas (1-5) y de B) 'Calcutta 4', en tejido sin inocular (0) y en diferentes estados de síntomas (1-3), (400 x)

La técnica histoquímica empleada permitió observar diferencias en la intensidad de la respuesta de la planta. En tal sentido, en 'Calcutta 4' se observó una mayor intensidad en la coloración del tejido respecto a las muestras de 'Grande naine', lo cual pudiera estar relacionado directamente con una mayor acumulación de peróxido de hidrógeno alrededor del posible sitio de infección (Figuras 3A y B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Asselbergh *et al.* (2007) en plantas de *Solanum lycopersicum*, quienes observaron una rápida y mayor acumulación de peróxido de hidrógeno en el sitio de inoculación del patógeno en un mutante resistente al hongo *Botrytis cinerea*, al compararlo con el genotipo silvestre.

Igualmente, la acumulación de peróxido de hidrógeno alrededor del sitio de infección ha sido observado y relacionado con el mecanismo de defensa en plantas en otros patosistemas como: *Sorghum vulgare*-*Sclerotium rolfsii* (Maurya *et al.*, 2007) y *Lactuca sativa*-*Bremia lactucae* (Lebeda *et al.*, 2008). Estos autores observaron la acumulación de

peróxido de hidrógeno solo en las plantas inoculadas y en una mayor proporción en las plantas resistentes respecto a las susceptibles.

El papel del  $H_2O_2$  en la defensa de la planta frente al patógeno ha sido demostrado, además, por autores como Cohen *et al.* (2009), los cuales observaron en plantas de *Lactuca sativa* L. tratadas con ácido  $\alpha$ -amino-butírico, con resistencia a *Bremia lactucae*, un aumento de la acumulación de peróxido de hidrógeno en el sitio de penetración del patógeno, mientras que en plantas no tratadas no se observó.

Se ha planteado que el incremento en la concentración de  $H_2O_2$  y de otras especies reactivas del oxígeno desencadena la respuesta hipersensible, así como la rápida muerte celular en el sitio de infección. Esto se traduce en la formación de lesiones visibles en las plantas (Mateo *et al.*, 2004). Además, se ha señalado que el  $H_2O_2$  tiene un papel importante en la restricción de la penetración de los patógenos, así como en la activación de varios genes relacionados con el proceso de defensa de la planta (Apel y Hirt, 2004).

### Acumulación de compuestos fenólicos

Se observó que las células cercanas al posible sitio de penetración de *M. fijiensis* se modificaron con la acumulación de compuestos fenólicos, la cual aumentó gradualmente en la medida en que evolucionaron los síntomas en ambos genotipos. La acumulación de fenoles solo se observó en el tejido foliar correspondiente a las lesiones de plantas inoculadas, no siendo así en el tejido sin síntomas de plantas controles (Figura 4A y B).

Chen *et al.* (2000) y Mohammadi y Kazemi (2002), en plantas de *Cucumis sativus* infectadas con *Pythium aphanidermatum* y en plantas de *T. sativum* inoculadas con *F. graminearum*, respectivamente, observaron la acumulación de fenoles en el tejido vegetal en las plantas inoculadas respecto a los controles empleando una técnica histoquímica similar. Igualmente, este resultado ha sido observado por varios autores en otros patosistemas en el tejido foliar de plantas inoculadas con el patógeno (Maurya *et al.*, 2007; Asselbergh *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009).

En este sentido, se ha señalado que la acumulación de fenoles cercano al sitio de penetración es una evidencia del desencadenamiento de la respuesta defensiva en las plantas y se ha descrito como uno de los eventos moleculares más importantes como parte del proceso defensivo ante el ataque por patógenos (Walters *et al.*, 2005). Además, los compuestos fenólicos se inducen en la mayoría de los tejidos vegetales como respuesta de defensa en la interacción con el patógeno y al igual que la lignina, los fenoles son de por sí tóxicos a los patógenos (Basha *et al.*, 2006) y su polimerización hace a la pared celular más gruesa y fuerte (Ferreira *et al.*, 2007).

Existen evidencias substanciales de que la rapidez de la respuesta histoquímica está relacionada directamente con la resistencia ante la infección en otras interacciones planta-patógeno como son *S. lycopersicum-Cladosporium fulvum* (Lazarovits y Higgins, 1976) y *S. lycopersicum-F. oxysporum*

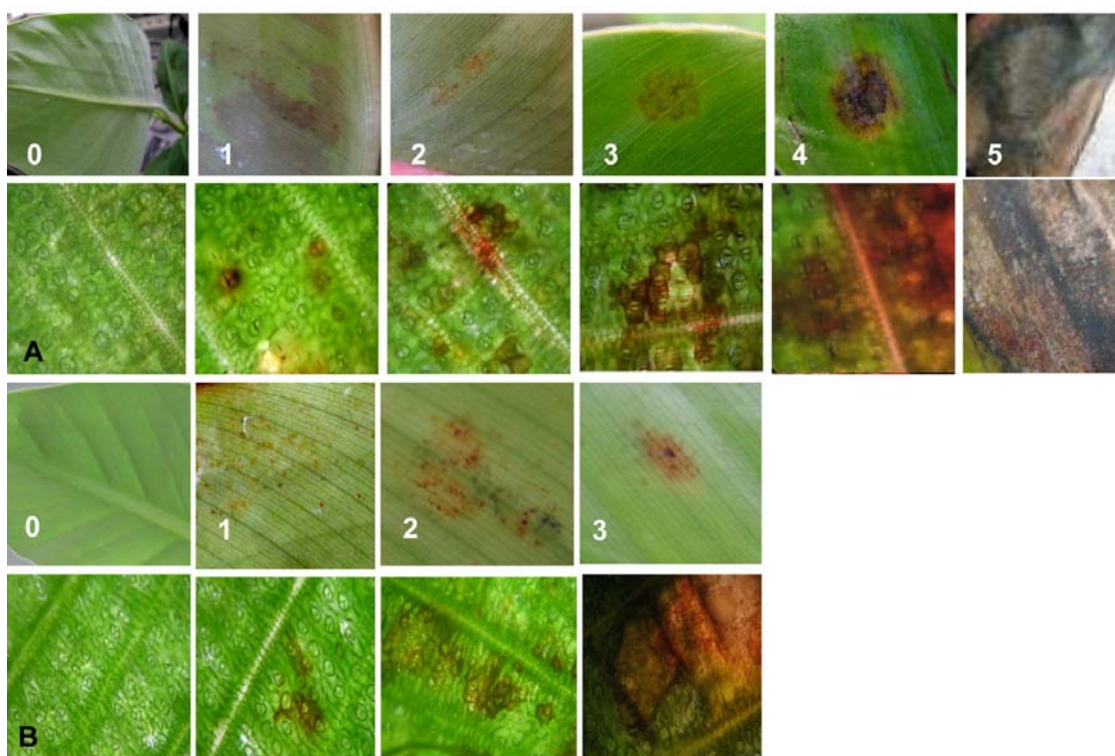


Figura 4. Acumulación de fenoles en hojas de plantas inoculadas con *M. fijiensis*, de A) 'Grande naine', en tejido sin síntomas (0) y en diferentes estados de síntomas (1-5) y de B) 'Calcutta 4', en tejido sin síntomas (0) y en diferentes estados de síntomas (1-3), (200 x)

## CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de lignina, peróxido de hidrógeno y fenoles en hojas de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' inoculadas con *M. fijiensis*, mediante el empleo de técnicas histoquímicas y se pudo corroborar que la acumulación de estos compuestos bioquímicos estaba relacionada con la respuesta de la planta ante la infección del patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló en el marco del Programa Institucional de Cooperación entre la Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas y el Consorcio de Universidades Flamenecas de Bélgica (IUC UCLV/VLIR).

## REFERENCIAS

- Alvarado, Y, Leiva M, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz M, Portal O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: (Jacome L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (eds)) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, pp. 169-175. INIBAP, Montpellier
- Apel, K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399
- Arzanlou, M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater MF, Buddenhagen IW, Viljoen A, Crous PW (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs of banana. *Persoonia* 20:19-37
- Asselbergh, B, Curvens K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke van BF, Höfte M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144:1863-4877
- Balint-Kurti, PJ, May GD, Churchill ACL (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters* 195: 9-15
- Basha, SA, Sarma BK, Singh DP, Singh UP (2006) Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiol* 51: 463-468
- Beardmore, J, Ride JP, Granger JW (1983) Cellular lignification as a factor in the hypersensitive resistance of wheat to stem. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 209-220
- Beckman, CH, Mueller WC, Tessier BJ, Harrison NA (1982) Recognition and callose deposition in response to vascular infection in *fusarium* wilt-resistant or susceptible tomato plants. *Physiol Plant Pathol* 20:1-10
- Chen, CQ, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 56:13-23
- Cohen, Y, Rubin AE, Kilfin G (2009) Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- $\alpha$ -amino-butyric acid (BABA). *Eur J Plant Pathol* 11-31
- Eyles, A, Mohammed CL (2002) Comparison of CEPA (2-chloroethyl phosphonic acid) induced responses in juvenile *Eucalyptus nitens*, *E. globulus* and *E. obliqua*: a histochemical and anatomical study. *IAWA* 23: 419-430
- Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 5: 677-700
- Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2006) Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Crit Rev Plant Sci* 25: 505-524
- Fouré, E (1985) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. *Fruits* 40: 393-399
- Gómez-Lim, M, Gonzalez J, Ortiz J, Aguilar M, Sandoval J (2002) Generation of transgenic banana (cv. gran nain) containing antifungal genes as a means to confer resistance to Black Sigatoka. En: Acobat, Memorias XV Reunión. Realizada en Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 02 noviembre de 2002. Medellín (COL): Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA 2002. Medellín
- Hernández, A, Pérez L (2001) Reaction of Banana and plantains cultivars to Black Sigatoka disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Epidemiological components of the resistance. *Fitosanidad* 5(3): 9-19



- Hernández, Y, Portillo F, Portillo MP, Navarro C, Rodríguez M, Velasco J (2006) Densidad estomática en materiales de plátano (*Musa* AAB, AAAB y ABB) susceptibles y resistentes a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). Rev. Fac. Agron 23(3):114-121
- Khurana, SMP, Pandey SK, Sarkar D (2005) Apoptosis in plant disease response: A close encounter of the pathogen kind. Current Sci. 88:740-752
- Lazarovits, G, Higgins VJ (1976) Biological activity and specificity of a toxin produced by *Cladosporium fulvum*. Physiol. Biochem 69:1056-1061
- Lebeda, A, Sedlarova M, Petrivalsky M, Prokopova J (2008) Diversity of defence mechanisms in plant-Oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. European Journal of Plant Pathology 122: 71-89
- Leiva-Mora, M (2008) Evaluación temprana *Musa* spp. a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En casa de cultivo. Tesis para aspirar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 100 p
- Martin, KP, Zhang C, Slater A, Madassery J (2006) Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 51-59
- Mateo, A, Mühlenbock P, Restérucchi C, Chi-Chang C, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski S (2004) Lesion Simulating Disease required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. Plant Physiol 136: 2818-2830
- Maurya, S, Singh R, Singh DP, Singh HB, Srivastav JS, Singh U (2007) Phenolic compounds of *Sorghum vulgare* in response to *Sclerotium rolfsii* infection. Journal of Plant Interactions 2(1): 25-29
- Mohammadi, M, Kazemi H (2002) Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science 162:491-498
- Molina, O, Castaño J (2003). Resistencia en los FHIA híbridos a *Mycosphaerella* spp. INFOMUSA. 12 (2):25-27
- Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 120 p.
- Raut, SP, Ranade S (2004) Diseases of Banana and their Management. En: Naqui, SAMH (ed) Diseases of Fruits and Vegetables, pp. 37-52. Volume II. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Reeve, RM (1951) Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. Stain Technology 26: 91-96
- Reimers, PJ, Leach JE (1991) Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice *Oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues, Physiol. Mol. Plant Pathol 38: 39-55
- Robb, J, Powell DA, Street PFS (1987) Time course of wall-coating secretion in *Verticillium*-infected tomatoes. Physiol. Plant Pathol. 31:217-226
- Sandoval, J, Müller, L (1999) Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). CORBANA 24(51): 43-60
- Smith, AH, Gill WM, Pinkard EA, Mohammed CL (2007) Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. For. Path 37: 361–373
- Southerton, SG, Deverall BJ (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. Phys. Mol. Plant Path 36: 483-494
- Thordal-Christensen, H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. Plant Journal 11: 1187-1194
- Vianello, A, Zancani M, Peresson C, Petrusa E, Casolo V, Patui S, Braidof E, Macri F (2007) Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. Physiologia Plantarum 129: 242-252
- Walters, D, Newton A, Lyon G (2005) Induced resistance: Helping plants to help themselves. Biologist 52: 28-33
- Zeyen, RJ, Bushnell WR, Carver TLW, Robbins MP, Clark TA, Boyles DA, Vance CP (1995) Inhibiting phenylalanine ammonia-lyase and cinnamoyl alcohol dehydrogenase suppresses Mla1 (HR) but not Mlo5 (Non-HR) barley powdery mildew resistances. Physiol Mol Plant Pathol 47: 119-140