

Construcción y secuenciación parcial de una biblioteca sustractiva en 'Calcutta 4' (*Musa AA*) en estadio temprano de infección con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Milady Mendoza-Rodríguez*, Amina Sánchez-Rodríguez, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Orelvis Portal, Elio Jiménez *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: milady@ibp.co.cu

RESUMEN

El estudio de los genes involucrados en la respuesta de defensa en la planta contra el ataque de patógenos, es uno de los pasos más importantes para la elucidación de los mecanismos moleculares de resistencia a enfermedades. La generación de bibliotecas sustractivas de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), por medio de la técnica de hibridación sustractiva por supresión, ha sido utilizada para este propósito. En este trabajo se realizó una hibridación sustractiva, entre el ADNc obtenido de hojas de 'Calcutta 4' inoculadas con *M. fijiensis* (CCIBP-Pf83) y una mezcla de ADNc de hojas de 'Calcutta 4' no inoculadas y del micelio del hongo. Las muestras de hojas se tomaron a los 6, 10 y 12 días posteriores a la inoculación. La biblioteca sustractiva se obtuvo por clonación y transformación de los productos sustraídos y como resultado se obtuvieron 600 clones recombinantes. El análisis de secuencia de 69 clones reveló redundancia de las secuencias blanco expresadas, la mayoría no mostró homología con secuencias en las bases de datos. El 13 % tuvo alta homología con metalotioninas. Los resultados constituyen un paso de avance en el estudio a nivel molecular de la interacción *Musa- Mycosphaerella fijiensis*.

Palabras clave: hibridación sustractiva por supresión, interacción Banano-*Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., Sigatoka negra

ABSTRACT

The study of genes involved in plant defense response against pathogen attack, is one of most important steps leading to the elucidation of disease resistance molecular mechanisms. The generation of subtracted deoxyribonucleic acid libraries (cDNA), by means of suppression subtractive hybridization technique (SSH), has been used for this purpose. A subtractive hybridization was made between a cDNA population obtained from 'Calcutta 4' inoculated leaves with *M. fijiensis* (CCIBP-Pf83) and a mixture of cDNA from 'Calcutta 4' non inoculated leaves and mycelium. Leaves samples were taken at 6, 10 and 12 days after inoculation. The subtracted library was obtained by cloning and transformation of subtracted products and as a result, 600 recombinants clones were obtained. Sequence analysis of sixty nine clones, revealed redundancy of the expressed sequence tags and most of them showed no homology with reported sequences at databases and only 13 % had a high homology with metalothioneins. The results constitute a step in advance in the molecular study of *Musa-Mycosphaerella fijiensis* interaction.

Key words: Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interaction, Black Sigatoka, *Musa* spp., suppression subtractive hybridization

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet, anamorfo) (Crous, 2003), ha sido reconocida como la principal enfermedad foliar que afecta bananos y plátanos a nivel mundial (Marín *et al.*, 2003).

La búsqueda de resistencia a esta enfermedad, ha sido el objetivo principal para varios grupos de investigación desde su surgimiento, pero aún no se logran avances significativos a través del mejoramiento convencional, ni mediante la utilización de técnicas biotecnológicas (Swennen *et al.*, 2004).

Por este motivo el empleo de la biología molecular y la ingeniería genética, se presentan como herramientas útiles en los estudios relacionados con la resistencia a patógenos en plantas. Dentro de ellas la transformación genética ha sido ampliamente utilizada para estos propósitos (Pérez *et al.*, 2006). La transformación ha sido realizada tanto por pistola de genes (Becker *et al.*, 2000), como mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Ganapathi *et al.*, 2001; Tripathi *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2006); con el empleo de genes reporteros o que codifican para proteínas antifúngicas (Sreeramanan, 2006) continúa una de las estrategias a seguir, para la obtención de plantas transgénicas con resistencia a hongos.

En los últimos 5 años a partir del desarrollo de las nuevas herramientas de la genómica, las investigaciones en el género *Musa*, han estado encaminadas a la búsqueda de nuevas fuentes (genes) de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Para este propósito han sido utilizados genotipos silvestres, que presentan resistencia a la enfermedad. Una de las vías empleadas, ha sido la realización de bibliotecas de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómicas y complementarias (ADNc). Las genómicas, mediante el empleo de diferentes vectores, para la obtención de información acerca del genoma y las complementarias, por la realización de bibliotecas sustractivas, a partir del método de Hibridación Sustractiva por Supresión (Diatchenko *et al.*, 1996), con el fin de obtener genes expresados diferencialmente ante la infección con el patógeno. De este modo, han sido realizadas varias bibliotecas genómicas, entre ellas: en *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides* 'Calcutta 4', utilizando como vector un Cromosoma Bacteriano Artificial (BAC, del inglés *Bacterial Artificial Chromosome*) (Vilarinhos *et al.*, 2003), en *Musa balbisiana* 'Pisang Klutuk Wulung' (Šafá *et al.*, 2004) y en *Musa acuminata* 'Tuu' en el vector Cromosoma Bacteriano Artificial Binario (BIBAC, del inglés *Competent Binary Bacterial Artificial Chromosome*) (Ortiz *et al.*, 2005) y como resultado se cuenta con un gran número de clones con información importante para el análisis completo del genoma. Con respecto a las bibliotecas de ADNc, Dagert *et al.* (2002) realizaron una biblioteca sustractiva en el cultivar Yangambi km5 y como resultado encontraron la expresión de una glucanasa, como respuesta a la infección con *M. fijiensis*.

El método de hibridación sustractiva ha sido empleado para la obtención de genes expresados diferencialmente en plantas, ante la presencia de factores bióticos y abióticos. Por ejemplo, Xiong *et al.* (2001), encontraron genes en *Oryza sativa* que se expresaban diferencialmente ante la infección con *Magnaporthe grisea* y Shim *et al.* (2004) identificaron genes en *Oryza sativa*, relacionados con el estrés por la infección con *Magnaporthe grisea*.

En este trabajo se utiliza la técnica de hibridación sustractiva, para realizar un estudio a nivel molecular de la interacción *Musa-Mycosphaerella fijiensis*, mediante la construcción de una biblioteca sustractiva por supresión en el genotipo silvestre *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides* 'Calcutta 4', el cual presenta resistencia a la enfermedad Sigatoka negra, con el objetivo de identificar secuencias expresadas diferencialmente, que pudieran estar relacionadas con la respuesta incompatible en estadios tempranos de la infección con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

MATERIALES Y METODOS

Fuente del hongo y las plantas

Se utilizó el aislado CCIBP-Pf83 de *Mycosphaerella fijiensis*, perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (UCLV, Cuba).

Fueron utilizadas plantas de banano 'Calcutta 4' (AA), obtenidas del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT, Santo Domingo, Cuba) y de 'Grande naine' (*Musa* AAA) del Instituto de Biotecnología de las Plantas, como control del experimento. Las mismas se propagaron *in vitro* según la metodología propuesta por Orellana (1994) y se aclimatizaron por ocho semanas en casas de cultivo, hasta que alcanzaron una altura de 20 cm y cuatro hojas activas.

Inoculación con *Mycosphaerella fijiensis*

La inoculación de las plantas de 'Calcutta 4' y de 'Grande naine', se realizó con una suspensión micelial del patógeno (CCIBP-Mf83) según el protocolo descrito por Alvarado-Capó *et al.* (2003).

Se tomaron muestras de plantas de 'Calcutta 4' inoculadas y no inoculadas (dos hojas de dos plantas) a los 6, 10 y 12 días posteriores a la inoculación (dpi). A las hojas se les eliminó la nervadura central, sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Purificación del ácido ribonucleico total y mensajero (ARN total y ARNm)

La purificación de ARN total de las muestras de hojas se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Liao *et al.* (2004) y el ARN de micelio del hongo liofilizado según Sánchez *et al.* (2006). La integridad del ARN total resultante, fue analizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en tampón TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM H_3BO_3 , 2 mM EDTA, pH 8.0), el cual fue teñido con Bromuro de Etidio (EtBr) 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La determinación de la concentración y la pureza de las muestras se realizó por espectrofotometría (*BioPhotometer* Eppendorf).

Para la purificación del ARNm, se utilizaron 500 μg de cada ARN total tanto de plantas como del hongo, mediante el sistema comercial *Oligotex® mRNA Mini Kit* (Qiagen, GmbH). La integridad, pureza y concentración de los ARNm, se verificó de igual modo a como se refirió anteriormente. Las muestras purificadas se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Hibridación sustractiva

La hibridación sustractiva se realizó con los ADNc obtenidos a partir de 2 µg de ARNm de 'Calcutta 4' inoculado y una mezcla sustractora de 1 µg de ARNm de la planta no inoculada y 1 µg de ARNm del hongo, según el protocolo descrito por Diatchenko *et al.* (1996). La concentración total de ARNm de plantas, fue una mezcla de los ARNm purificados a los 6, 10 y 12 dpi. Se siguieron las instrucciones del sistema comercial *PCR-Select cDNA Subtraction* (BD Biosciences Clontech), con la salvedad de que se realizaron 32 ciclos para el PCR primario y 17 ciclos para el secundario y se adicionaron 1.25 unidades de la enzima *Taq* ADN Polimerasa (Promega) en cada reacción. Las amplificaciones se realizaron en una máquina de PCR *Mastercycler® personal* (Eppendorf).

Los productos de la sustracción se separaron en un gel de agarosa al 2 %, en tampón TAE 1X (40mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 2mM EDTA pH 8.0), el cual fue teñido con EtBr 0.5 µg.ml⁻¹.

Biblioteca sustractiva

La biblioteca sustractiva se confeccionó por la clonación de los productos de la sustracción, en el vector pTZ57R/TDNA, del sistema comercial *InsT/Aclone™ PCR Product Cloning* y la transformación en la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue, con el sistema comercial *Transform Aid™ Bacterial transformation*, (Fermentas). Las colonias recombinantes se seleccionaron en medio de cultivo selectivo, que contenía isopropil-β-D-thiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X Gal) 40 µg.ml⁻¹ y como antibiótico de selección para el plasmidio, ampicilina 100 µg.ml⁻¹. Los transformantes positivos, se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*) de colonias, en un volumen final de 20 µl que contenía 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 pmol de los oligonucleótidos M13 FW (5'-GTAAAA CGACGG CCA GT-3') y Rev (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), tampón PCR 1X y 1U *Taq* ADN polimerasa (Promega). El PCR fue iniciado por desnaturalización a 94 °C por 10 min, seguido de 25 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min y un paso de enfriamiento a 4 °C.

Secuenciación de clones y comparación de secuencias en bases de datos

Se secuenciaron 69 fragmentos de genes de la biblioteca sustractiva. Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante el algoritmo BLAST, con la matriz BLOSUM62 (Altschul *et al.*, 1997). Se consideraron como índice de homología significativo en la alineación de la cadena de bases nitrogenadas

(BLASTN), los valores de E menores que 0.0001 (Newman *et al.*, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inoculación con *Mycosphaerella fijiensis*

El empleo del homogenizado micelial de *M. fijiensis*, en las condiciones de luz y humedad existentes en la casa de cultivo, permitió un adecuado desarrollo de los síntomas de la enfermedad Sigatoka negra; lo cual se verificó visualmente en las plantas de 'Grande naine' empleadas como control del experimento. Este resultado concuerda con lo planteado por Alvarado-Capó *et al.* (2003), quienes demostraron la posibilidad de la inoculación artificial de las plantas en condiciones controladas, como un método fácil, rápido y factible para obtener el desarrollo homogéneo y uniforme de los síntomas, en hojas inoculadas de plantas procedentes del cultivo *in vitro*.

Purificación del ácido ribonucleico total y mensajero (ARN total y ARNm)

Los niveles de pureza de ARN total a partir de hojas sanas, hojas infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* de 'Calcutta 4', así como del micelio del hongo, fueron superiores a 1.9, resultados que concuerdan con lo planteado por Sambrook *et al.* (1989). La concentración de ARN total por gramo de tejido osciló entre 2.5 y 3 µg.µl⁻¹, además, no se observó degradación de los ácidos ribonucleicos purificados, después de verificada su integridad en un gel de agarosa. Los resultados en cuanto a la calidad y pureza de los ARN totales, indicaron la ausencia de impurezas en las purificaciones realizadas. El aislamiento de ácidos nucleicos con calidad (libre de proteínas, ADN genómico y metabolitos secundarios), es fundamental para la construcción de una biblioteca; ya que la presencia de estas sustancias contaminantes pueden afectar la calidad y rendimientos del material genético a obtener (Asif *et al.*, 2000). Se obtuvieron purificaciones de ARNm, a partir de los ARN totales con valores de pureza superior a 2, concentración y la calidad necesaria para su empleo.

Hibridación sustractiva y biblioteca sustractiva

La comprobación realizada al producto de la hibridación sustractiva, mostró una disminución en cuanto al número de secuencias amplificadas, luego de terminado el segundo PCR, en relación con la muestra antes de la sustracción (Figura 1) y la longitud de estos fragmentos varió en un rango de 0.2 kb a 0.7 kb aproximadamente.

Se obtuvo la biblioteca sustractiva por supresión, para *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides* 'Calcutta 4', en un estadio temprano de la infección con el

hongo *M. fijiensis* Morelet (6, 10 y 12 dpi), con un total de 600 clones recombinantes. Los resultados del análisis por PCR de colonias, mostraron que la longitud de los fragmentos osciló entre 300 y 700 pares de bases (pb) (Figura 2). La longitud de las secuencias blanco expresadas obtenidas fue la esperada ya que según Diatchenko *et al.* (1996), como resultado de la hibridación, se deben obtener fragmentos de aproximadamente 600 pb, lo cual está dado por la enzima de restricción que se utiliza en el protocolo. También concuerda con Xiong *et al.* (2001), quienes obtuvieron como resultado del análisis de una biblioteca sustractiva en arroz (*Oryza sativa* L.), que la longitud de algunos de los fragmentos secuenciados oscilaba entre 200 y 600 pb.

Secuenciación de clones y comparación de secuencias en bases de datos

Del análisis por comparación de secuencias con los genes publicados en la base de datos GenBank, se evidenció que existió redundancia en los resultados para las 69 secuencias nucleotídicas en estudio. Se

obtuvieron 9 (13 %) secuencias blanco expresadas (ESTs, por sus siglas del inglés *Expressed Sequence Tags*), con homología para metalotioninas (MTs) (proteína MWMT3 similar a una metalotionina encontrada en *Musa acuminata* AF268393) (Liu *et al.*, 2002), además de ausencia de homología para la mayoría de las secuencias.

Aún cuando la función de las metalotioninas no está completamente dilucidada en plantas, se ha demostrado su papel en la detoxificación de metales y homeostasis tanto en organismos eucariotas como en procariontes (Ling *et al.*, 2004). La inducción de estas proteínas como parte de la respuesta de defensa de la planta, ante la infección con el patógeno en la interacción *Musa-M. fijiensis*, concuerda con resultados referidos anteriormente acerca del papel de las mismas en el estrés oxidativo en plantas (Choi *et al.*, 1996).

Como continuación de este trabajo, se seguirá con la caracterización de las secuencias obtenidas en la biblioteca sustractiva, mediante el uso de las herramientas bioinformáticas.

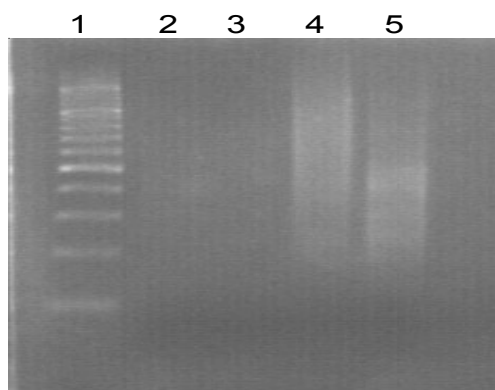


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa/TAE 1X al 2 % teñido con BrEt 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. 1) O'RangeRuler™ 100 bp, 2 y 3) PCR primario, 4 y 5) PCR secundario de ADNc de 'Calcutta 4' digerido con la enzima *Rsa* I antes de sustraer y después de la hibridación.

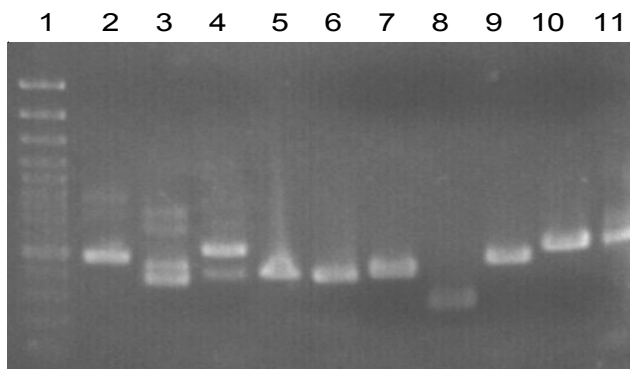


Figura 2. Fragmentos de ADN como resultado del PCR de colonias de 10 clones al azar de la biblioteca sustractiva, aplicados en gel de agarosa al 1 % y teñidos con BrEt 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. 1) Marcador de peso molecular O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder, 2-10) diferentes clones.

REFERENCIAS

- Alvarado-Capó, Y, Leiva M, Dita MA, Acosta M, Cruz M, Portal N, Gómez R, García L, Bermúdez I y Padrón J (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (eds) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, pp. 169-175. INIBAP
- Altschul, SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Asif, MH, Dhawan P, Nath P (2000) Simple Procedure for the Isolation of High Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plan. Molecular Biology Reporter* 18: 109-115
- Becker, DK, Dugdale B, Smith MK, Harding RM, Dale JL (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv Gran Nain via microprojectile bombardment. *Plant Cell reports* 19: 229-234.
- Choi, D, Mo H, Keun H, Park JA, Taek W, Hae S (1996) Molecular Cloning of a Metallothionein-Like Gene from *Nicotiana glauca* L. and Its Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol.* 11 (2): 353-359
- Chong, B, Bermúdez I, López J, Machado JM, Portal O, Alvarado Y, Swennen R, Sagi L y Gómez R (2004) Genetic transformation using chimeric antifungal genes. 1st. International Congress on Musa: Harnessing research to improve livelihoods 6-9 July. Penang, Malaysia
- Crous, PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X, Carlier J (2003) Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases in San José, Costa Rica, pp. 43-58. INIBAP
- Dagert, M, Boscán K, Briceño A, Rangel S (2002) Búsqueda de genes de defensa contra la Sigatoka Negra en musáceas. En: Acorbat. Memorias XV reunión. Realizada en Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 02 noviembre. Medellín (COL): Asociación de bananeros de Colombia AUGURA. pp. 54-58
- Diatchenko, L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchick A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:6025-6030
- Ganapathi, TR, Higgs NS, Balint-Kurty PJ, Arntzen CJ, May GD, Van Eck JM (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell reports* 20: 157-162
- Gómez, MA, González JA, Ortiz JL, Sandoval J, Aguilar ME (2004a) Genetic transformation of cv. 'Grande naine'. 1st International Congress on Musa: Harnessing research to improve livelihoods 6-9 July. p 18. Penang, Malaysia
- Gómez, MA, González JA, Ortiz JL, Aguilar ME, Sandoval J (2004b) Logros y perspectivas de la transformación genética en banano. En: Memorias de XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004, pp. 165-169. Oaxaca, México
- Liao, Z, Chen M, Gong Y, Tang F, Sun X y Tang K (2004) Rapid isolation of high quality total RNA from *Taxus* and Ginkgo. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 34 (3): 209-214
- Ling, H, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K y Shimamoto K (2004) Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small GTPase OsRac1 in Rice. *Plant Physiology* 135: 1447-1456
- Liu, P, Chong G, Chiang L y Eng P (2002) Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiologia Plantarum* 114 (2): 241
- Marín, DH, Romero RA, Guzmán M y Sutton TB (2003) Black Sigatoka: An increasing treath to banana cultivation. *Plant disease* 87 (3): 208-222
- Newman, T, de Bruijn FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohigge L, Raikhel N, Sormeville S, Thomasshow M, Retzel E y Sormeville C (1994) Gene galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones. *Plant Physiol* 106: 1241-1255
- Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación de clones de *Musa* spp. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, IBP. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara
- Ortiz, E, Kaemmer D, Zhang HB, Muth J, Rodríguez M, Arias C, James A (2005) Construction and characterization of a plant transformation-competent BIBAC library of the black Sigatoka-resistant banana *Musa acuminata* cv. Tuu Gia (AA). *Theoretical and Applied genetics* 110 (4): 706-713
- Pérez, JB, Swennen R, Sági L (2006) Number and accuracy of T-DNA insertions in transgenic banana (*Musa* spp.) plants characterized by an improved anchored PCR technique. *Transgenic Research* 15:139-150
- Šafář, J, Noa JC, Vrána J, Bartoš J, Alkhimova O, Sabau X, Šimková H, Lheureux F, Caruana ML, Dole J, Piffanelli P (2004) Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome* 47: 1182-1191
- Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Extraction, Purification and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells. *Molecular Cloning a Laboratory Manual Second Edition*
- Sánchez, A, Portal O, Mendoza M, Acosta M, Jiménez E (2007) Improved method for isolation of High-quality total RNA from *M. fijiensis*. VII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, 17-21 de Abril de 2006. Santa Clara, CUBA
- Sreeramanan, S, Maziah M, Rosli NM, Sarriá M, Xavier R (2006) Particle bombardment-mediated Co-transformation of Chitinase and α -1,3 glucanase genes in Banana. *Biotechnology* 5 (2): 203-216
- Shim, KS, Cho SK, Jeung JU, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Kang KH, Hwang HG, Choi HC, Moon HP, Shin JS (2004) Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Rep.* 22:599-607
- Swennen, R, Markham R, Frison E (2004) Applying Biotechnology in Banana and Plantain: Implications for developing countries. PBI Bulletin. *Biotechnology and Developing Countries: The potential and the challenge* 2: 22-27
- Tripathi, L (2003) Genetic engineering for improvement of *Musa* production in Africa. *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 503-508

Tripathi, L, Tripathi JN y Hughes J (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of plantain (*Musa* spp.) cultivar Agbagba. African Journal of Biotechnology 4 (12): 1378-1383.

Vilarinhos, AD, Piffanelli P, Lagoda P, Thibivilliers S, Sabau X, Carreel F y D'Hont A (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa*

acuminata Colla). Theoretical and Applied Genetics 106 (6): 1102-1106

Xiong, L, Lee MW, Qi M y Yang Y (2001) Identification of Defense-Related Rice Genes by Suppression Subtractive Hybridization and Differential Screening. MPMI 14 (5): 685-692