

Prueba *in vitro* de callos de genotipos seleccionados de *Coffea arabica* L. para evaluar la susceptibilidad a antracnosis¹

Ramón Antonio Ramos-Navas,** Wondyifraw Tefera,* Felipe Martínez-Suárez,** Arega Zeru,* Demelach,* María Esther González-Vega*** y Adolfo Ramos-Marzan**

Resumen

La antracnosis de los cafetos es causada principalmente por hongos del género *Colletotrichum*, que producen lesiones profundas y bien delimitadas sobre las zonas de las plantas atacadas; son responsables de destrozos en los frutos, ramas y hojas; con frecuencia causan destrucciones letales para las plantaciones. El objetivo de este trabajo es evaluar *in vitro* el efecto de un filtrado parcialmente purificado del patógeno *Colletotrichum kahawae* sobre callos de cuatro selecciones de café (741 altamente resistente al CBD, 744 moderadamente resistente al CBD, 74 110 susceptible al CBD y kurume susceptible al CBD). Dos aislados de *C. kahawae* (Gera y Melko) obtenidos en el laboratorio de fitopatología de JARC fueron utilizados. La fitotoxicidad del filtrado se probó en hojas e hipocótilos de café. Se aplicaron varias concentraciones del extracto acuoso (1, 5 y 10 % v/v en 50 mL de medio de cultivo). Medios de cultivos de callos sin extracto acuoso fueron utilizados como control. Se observaron los cambios de coloración en callos y medio de cultivo líquido, y se midió la absorbancia a $wv/\lambda = 350$ nm luego de la centrifugación. Respuesta bien definida, caracterizada con presencia de lesiones superficiales en forma de pequeñas depresiones (chancros) de color marrón y negro, se obtuvieron en hipocótilos de cafetos susceptibles cuando se inocularon con el extracto estéril. Callos de color blanco cremoso fueron obtenidos a las ocho semanas de cultivo independientemente del genotipo de café evaluado. Los filtrados estériles de *Colletotrichum kahawae* (Gera y Melko) produjeron incremento en la absorbancia del medio de cultivo líquido de los callos de todos los germoplasmas de café evaluados comparado con el testigo, situación esperada en

Abstract

The antracnose of the coffees is caused mainly by mushrooms of the gender *Colletotrichum* that produce deep lesions and very defined on the areas of the attacked plants, they are responsible for destructions in the fruits, branches and leaves, frequently they cause lethal destructions for the plantations. The objective of this work is to evaluate *In Vitro* the effect of a partially purified filtrate of the patógeno *Colletotrichum kahawae* it has more than enough tripses of 4 selections of coffee (741 Highly resistant to the CBD, 744 Moderately resistant to the CBD, 74110 Susceptible to the CBD and Susceptible Kurume to the CBD). Two isolated of *C. kahawae* (Gera and Melko) obtained in the laboratory of fitopatología of JARC they were used. The fitotoxicidad of the filtrate was proven in leaves and hipocótilos of coffee. Several concentrations of the watery extract were applied (1, 5 and 10 % v/v in 50 mL of half of cultivation). Means of cultivations of tripses without watery extract were used as control. Was the cabios of coloration observed in tripses and half of cultivation liquidate and was the absorbancia measured to $wv/\lambda = 350$ nm after the centrifugación. Very defined answer, characterized with presence of superficial lesions in form of small depressions (chancres) of brown and black color they were obtained in hipocótilos of susceptible coffees when they were inoculated with the sterile extract. Tripes of creamy white color were obtained independently to the 8 weeks of cultivation of the genotipo of evaluated coffee. The sterile filtrates of *Colletotrichum kahawae* (Gera and Melko) they produced increment in the Absorbancia of the means of cultivation liquid of the tripses of all the evaluated germoplasmas of coffee compared with the witness. Situation waited in the design of the

¹ Recibido: 9/10/2012

Aprobado: 23/1/2013

*Jimma Agricultural Research Centre (JARC), Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR),

** UCTB Experimental Agro-Forestal III Frente, Cuba.

*** Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba

el diseño del experimento porque la absorbancia en el medio aumenta a medida que crece la concentración de sustancias que producen la coloración y la actividad metabólica que se estimula con la utilización de sustancias elicitoras, como son los extractos acuosos de microorganismos patógenos. Callos de los genotipos resistentes respondieron diferente a los de genotipos susceptibles en cuanto a coloración, al aplicar el extracto filtrado estéril de *Colletotrichum kahawae*, modelo que puede ser usado para diferenciar genotipos susceptibles de resistentes a antracnosis.

Palabras clave: antracnosis, *Colletotrichum kahawae*, CBD.

experiment because the absorbancia in the means increases in the measure that the concentration of substances that the coloration and the metabolic activity that it is stimulated with the use of substances elicitoras take place increases like they are the watery extracts of microorganisms patógenos. Tripes of the resistant genotipos responded different to those of susceptible genotipos as for coloration, when applying the sterile filtered extract of *Colletotrichum kahawae*. I model that can be used to differentiate susceptible genotipos of resistant to antracnose.

Key words: antracnose, *Colletotrichum kahawae*, CBD.

Introducción

La antracnosis de los cafetos es causada principalmente por hongos del género *Colletotrichum*, que producen lesiones profundas y bien delimitadas sobre las zonas de las plantas atacadas; son responsables de destrozos en los frutos, ramas y hojas; con frecuencia causan destrucciones letales para las plantaciones.

Los cruzamientos en busca de resistencia a la antracnosis se han hecho más fácil luego de la introducción de las técnicas de *screening* basadas en la inoculación de los hipocótilos de las plantas de café, con esporas del patógeno; pero la selección de germoplasmas combinando resistencia a esta enfermedad con otras cualidades agronómicas requiere de unos veinte años en esta perenne leñosa propagada por semillas especie.

El avance de las técnicas de cultivo *in vitro* ha permitido estudiar mecanismos inherentes de resistencias expresados en algunos callos, que incluso a través de células y protoplastos podría ser evaluada la interacción planta-patógeno, debido a que la exposición de células a diferentes concentraciones de toxinas resulta en la muerte o disminución del crecimiento o viabilidad, de lo que se pueden identificar las células sobrevivientes.

La antracnosis producida por la especie de hongo *Colletotrichum kahawae* primeramente ataca los frutos en desarrollos, conllevando a la enfermedad de las cerezas del café [Coffee Berry Disease (CBD)], que es uno de los mayores problemas, produciendo pérdidas generalmente mayores al 50 % y dependiendo de las condiciones ambientales.

El principio del método para el *screening* en el café arábica es identificar genotipos altamente resistentes y

susceptibles al CBD y observar la respuesta de estos ante la toxinas aisladas del *Colletotrichum kahawae*. Este tipo de técnica ofrece la posibilidad de diferenciar los genotipos de *Coffea arabica* L. con alta, moderada y baja resistencia, de esos completamente susceptibles. La resistencia o susceptibilidad de los diferentes materiales *in vitro* serán corroboradas con los previamente hechos en condiciones de campo, laboratorio y casa verde.

Técnicas para la evaluación *in vitro* y en el campo han sido desarrolladas y explotadas desde algunos años bajo el programa de *screening* a la antracnosis producida por la especie *Colletotrichum kahawae*. Estas incluyen la prueba del hipocótilo (*hypocotyl test*) seguido por la prueba de la cereza (*attached berry test*) y las evaluaciones de las lesiones físicas producidas en condiciones de campo. Prácticamente todas estas técnicas requieren del establecimiento de árboles de café en el campo, lo que en su mayor parte necesita un mínimo de seis a ocho años para lograr resultados concluyentes. Este problema claramente indica que existe una necesidad de desarrollar cualquier posible técnica de *screening* temprano dirigida a reducir el tiempo requerido para la evaluación en condiciones de campo, por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar *in vitro* el efecto de un filtrado parcialmente purificado del patógeno *Colletotrichum kahawae* sobre callos de cuatro selecciones de café (741 altamente resistente al CBD, 744 moderadamente resistente al CBD, 74 110 susceptible al CBD, kurume susceptible al CBD).

Materiales y métodos

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas y el Laboratorio de Fitopato-

logía en Jimma Agricultural Research Centre en Etiopía, durante el período comprendido entre enero de 2006 y diciembre de 2008.

Para la formación de callos en las cuatro selecciones de café (741 altamente resistente al CBD, 744 moderadamente resistente al CBD, 74 110 susceptible al CBD, kurume susceptible al CBD) se utilizaron semillas botánicas obtenidas del Departamento de Fitopatología que se germinaron *in vitro*. Segmentos de 1 cm de longitud obtenidos a partir de los hipocótilos de café fueron puestos en el medio de formación de callos formado por ½ MS (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas) y sacarosa (30 g/L) suplementado con 2,4 D (3 mg/L) y BA (3 mg/L); el pH se ajustó a 5,75 antes de solidificar con 7 g/L de agar y esterilizar. Los explantes se mantuvieron en condiciones de oscuridad y temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por un período de 8-10 semanas hasta la formación de callos. Estos fueron trasplantados para el mismo medio de formación de callos, pero sin agar para evaluar el efecto del extracto acuoso. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 20 réplicas (placas de Petri) y cuatro callos en cada placa.

Dos aislados de *C. kahawae* (Gera y Melko) obtenidos en el Laboratorio de Fitopatología de JARC fueron utilizados en este experimento. Luego de su identificación se cultivaron en Agar Papa Dextrosa (PDA) por un período de 10-14 días en oscuridad a temperatura de 22-25 °C y pH de $5,5 \pm 0,1$. Los ingredientes para el PDA fueron 4 g/L infusión de papa, 20 g/L dextrosa y 15 g/L agar. Los cultivos puros a partir de los monoconidios fueron preservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente (18-25 °C).

Agregados miceliales (5 mm diámetros) tomados de los cultivos puros fueron inoculados asépticamente en frascos de 250 mL, con el contenido de 100 mL de medio Czapek líquido (nitrato de sodio 2 g/L, fosfato bipotásico 1 g/L, cloruro de potasio 0,5 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g/L, sulfato de hierro heptahidratado 0,01 g/L y sacarosa 30 g/L) en agitadores orbitales a 120 r.p.m. de 22-25 °C por tres semanas. El contenido de los frascos fue homogenizado en una licuadora, colado a través de una doble capa de *cheese cloth* y filtrado al vacío con papel de filtro whatman. El filtrado fue esterilizado en filtro con poros de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ de diámetros (Nyange *et al.*, 1995). La fitotoxicidad del filtrado se probó en hojas mediante la inyección de 0,5

mL debajo de la epidermis de posturas intactas de tres meses de edad. También se inocularon posturas en estado de mariposa. Algunas hojas y posturas se trataron con agua destilada como control.

Las diferentes respuestas de los callos de los genotipos resistentes y susceptibles fueron estudiadas mediante la aplicación de varias concentraciones del extracto acuoso. Se adicionaron concentraciones de 1, 5 y 10 % v/v en 50 mL de medio de cultivo contenidos en frascos de 100 mL con tapa de rosca. Medios de cultivos líquidos de callos sin extracto acuoso fueron utilizados como control. Estos se mantuvieron en agitación suave por siete días para aumentar el contacto con las toxinas adicionadas.

Se midió la absorbancia a $\text{wv}/\lambda = 350\text{ nm}$ de los medios de cultivos de los medios de cultivos líquidos luego de la centrifugación.

Resultados y discusión

Un aspecto muy importante cuando se trabaja con estos sistemas de selección *in vitro* es la estandarización del agente selectivo y la confirmación de su potencial patogénico. Los aislados de *Colletotrichum kahawae* crecieron en forma de pelotas en el medio de cultivo líquido Czapek, y mostraron generalmente coloración blanca similar a lo reportado por Arega (2006) para dos subgrupos aislados. Uno de los cultivos evidenció producción de pigmentos color rojizo, que fue desechado por el riesgo de enmascarar resultados con otros microorganismos incapaces de producir CBD como el *Colletotrichum gloeosporioides*, que según el Plant Pathology Department of Florida (2003) bajo condiciones húmedas las masas de esporas aparecen color rosa o salmón en las lesiones que provocan.

Al estudiar el efecto del extracto crudo del hongo sobre hipocótilos y frutos de cafetos susceptibles se obtuvieron tallos completamente afectados (marchito y negro) y plántulas completamente muertas. Respuesta bien definida, caracterizada con presencia de lesiones superficiales en forma de pequeñas depresiones (chancros) de color marrón y negro se obtuvieron en hipocótilos de cafetos cuando se inocularon con el extracto estéril.

Callos de color blanco cremoso fueron obtenidos a las ocho semanas de cultivo en el medio de formación de callos (Fig. 1). Se observó homogeneidad en la colo-

ración de los callos independientemente del genotipo de café evaluado.

Varios tipos de fuentes celulares han sido utilizadas en los sistemas de selección *in vitro*. En la mayoría de los reportes consultados en la literatura actual emplean callos por ser más factible el trabajo con estos que con cultivos de células en suspensión y protoplastos, así como la regeneración de plantas, a partir de ellos, está estandarizada para la gran mayoría de las especies de plantas cultivadas, incluyendo al café.

Aunque algunos autores refieren que la oxidación fenólica se presenta menos en los explantes cultivados en medios líquidos que sólidos (De García y Rafael, 1989), el medio de cultivo líquido, que contiene los callos de los cuatro genotipos evaluados, se tornó de color marrón luego de la inoculación con las diferentes dosis del filtrado esterilizado de los patógenos (MS y GS). Se detectaron diferencias visuales en cuanto a la intensidad del color (Fig. 1), que posteriormente se evaluaron de forma cuantitativa utilizando colorimetría a una longitud de onda de 350 nm.

Rojas *et al.* (2011) señalan que los polifenoles liberados durante la lisis celular se oxidan a quinonas mediante la polifenoloxidasas con su actividad catecolasa y se hace evidente, pues el ácido nucleico presenta una coloración gris o parda.

Tomando en consideración que la elicitación se encuentra entre los factores que afectan el cultivo de callos, células vegetales y la producción de metabolitos secundarios mediante la activación o incremento del metabolismo, es que en el presente trabajo se utilizó una elicitación biótica (sustancia producida por organismos) y exógena con base en su origen derivado de microorganismos.

En la fig. 2 se observa que el filtrado estéril de *Colletotrichum kahawae* de la localidad Gera produjo incremento en la absorbancia del medio de cultivo líquido de los callos de todas las germoplasmas de café evaluados comparado con el respectivo tratamiento control, situación esperada en el diseño del experimento porque la absorbancia en el medio aumenta a medida que crece la concentración de sustancias que producen la coloración y la actividad metabólica que se estimula con la utilización de sustancias elicitoras, como son los extractos acuosos de microorganismos patógenos.

En este sentido, Pompeu *et al.* (2008) e Isaac *et al.* (2010) plantearon que factores ambientales como los patógenos pueden desencadenar el estrés oxidativo (ROS) y nitrosativo (RNS), que para Azofeifa (2009) constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*, y se manifiesta mediante el oscurecimiento en los explantes y el medio de cultivo.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo para otros germoplasmas los esbozan Orosco *et al.* (2002), que lograron el incremento en la producción de fitoalexinas (hidroxicinamoyltiraminas y compuestos fenólicos enlazados a la pared celular) en *Solanum tuberosum*, elicitando con filtrados de *Phytophthora infestans* y un incremento en la producción del sesquiterpeno ácido tesárico en cultivos celulares de *Tessaria absinthioides* mediante la utilización de extractos de *Verticillium* sp., *Monodictis cataneae*, *Acremonium* sp. y *Aspergillus niger*.

Se encontraron diferencias significativas entre los germoplasmas para el incremento de la absorbancia comparada con su respectivo tratamiento control cuando se utilizó el aislado de Gera. Los mayores incrementos de absorbancia fueron obtenidos en la selección susceptible (Kurume) para las tres dosis utilizadas del extracto acuoso de *Colletotrichum kahawae*. Los menores valores de absorbancia se presentaron en la selección resistente 741.

No se obtuvieron diferencias significativas entre las dosis para un mismo germoplasma. En el germoplasma 2 (744) se obtuvieron valores relativos de absorbancia superiores al germoplasma 3 (74 110) para concentraciones del 1 %.

Tomando en consideración el incremento relativo de la absorbancia, se encontró que las respuestas de los cuatro germoplasmas al inóculo aislado de Melko fueron superiores a las obtenidas cuando se utilizó el aislado de Gera.

El comportamiento no similar de los cultivares evaluados con los extractos de los dos aislados (GS y MS) está en relación con Biratu (1995) cuando reconoce que la resistencia del cultivar 741 podría considerarse como horizontal o no rasa específica, mientras los cultivares 74 110 y 744 mostraron susceptibilidad y mezcla (susceptibles para algunas y resistentes para otros), respectivamente.

En la fig. 3 se aprecia que a medida que se aumenta la dosis para un mismo germoplasma, incrementa la absorbancia relativa, existiendo diferencias significativas entre la selección susceptible y resistente.

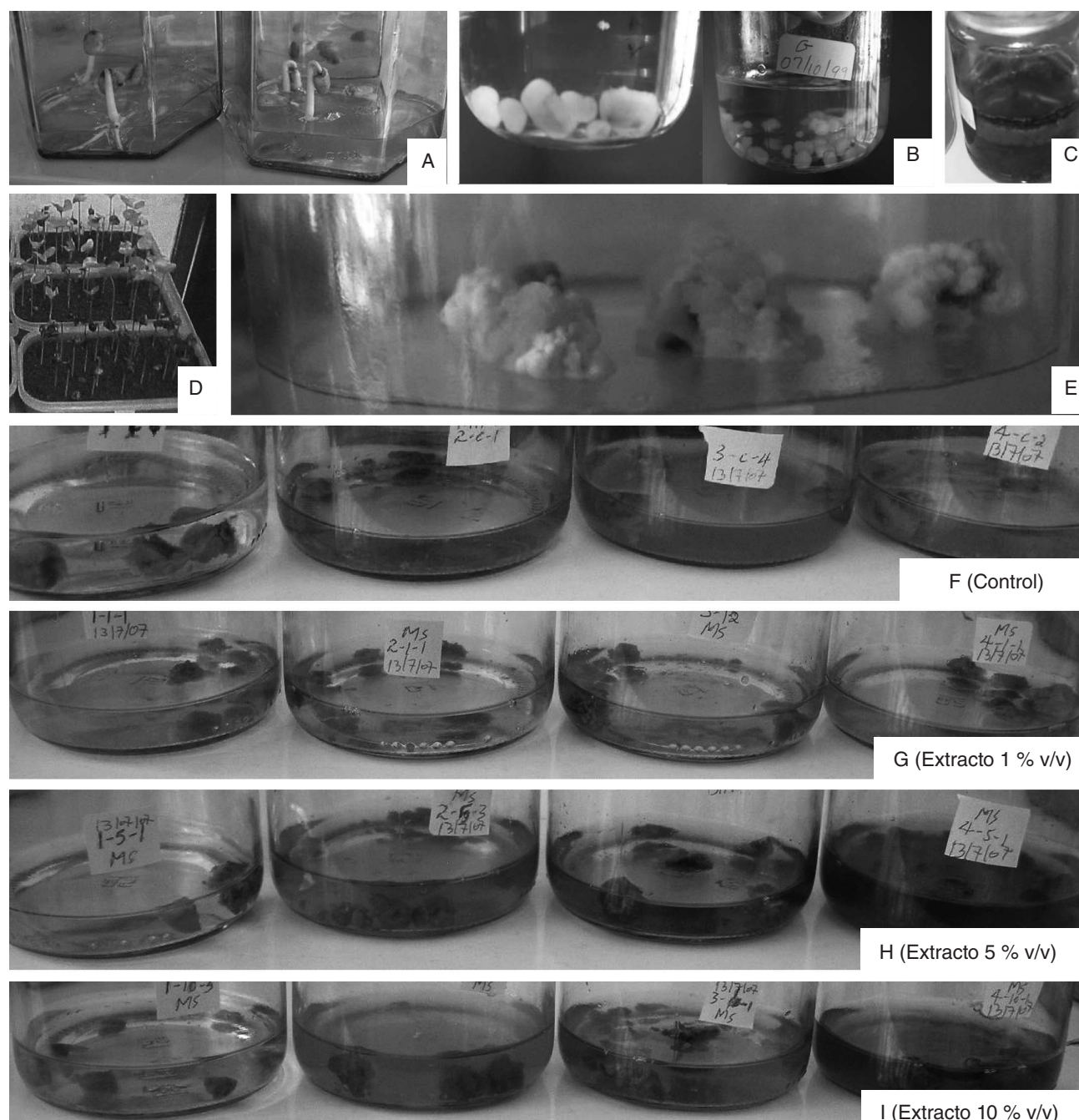


Fig. 1. *Screening* de genotipos de café a la antracnosis. A) Plantas de café en estado de fosforito a partir de las cuales se obtuvieron los hipocótilos como explantes inicial para la formación de los callos. B) Aislados puros de *Colletotrichum kahawae* (Gera y Melko) luego de 23 días cultivados en medio líquido Czapek. Estos fueron los utilizados para las etapas posteriores del experimento. C) Aislado de *Colletotrichum kahawae* con producción de pigmentos rojos que no influyen en la patogenicidad, pero sí interfieren en la coloración de los callos, por lo que fueron desechados para el *screening*. D) Plántulas de café en estado de mariposa, de germoplasmas susceptibles infectadas con el patógeno utilizado en el experimento (fuente: Arega, 2006). E) Callos blancos cremosos a partir de hipocótilos de café. F), G), H) e I) Callos de café de 741 altamente resistente al CBD, 744 moderadamente resistente al CBD, 74 110 susceptible al CBD y kurume susceptible al CBD (de izquierda a derecha) con diferente coloración por la aplicación del extracto acuoso en concentraciones del 1, 5 y 10 %, respectivamente.

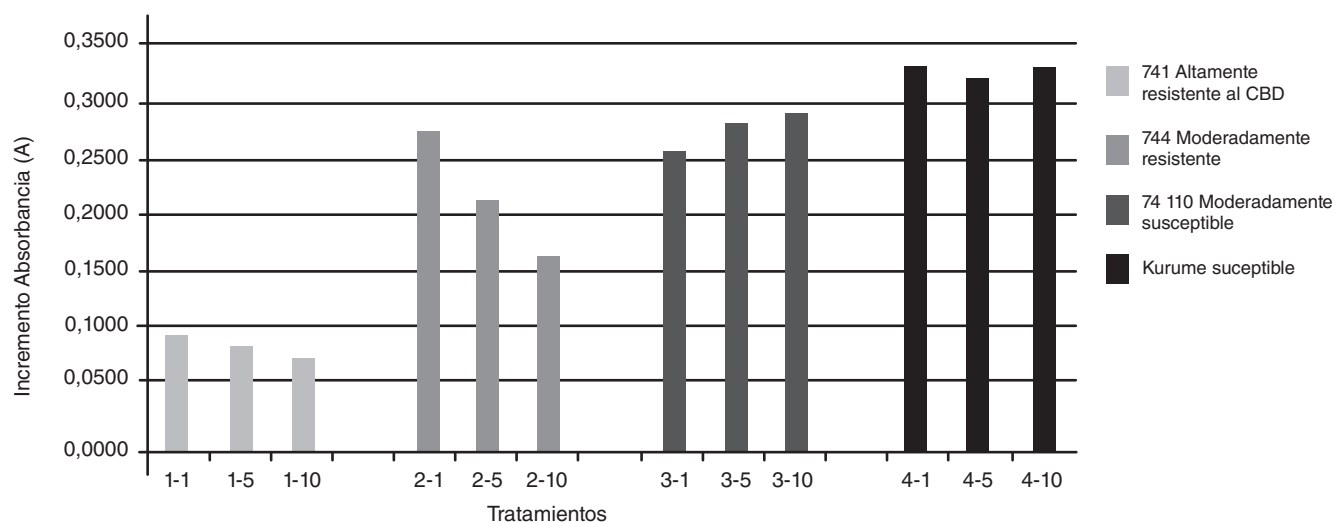


Fig. 2. Comportamiento de callos de los cuatro genotipos evaluados ante las inoculaciones del filtrado estéril de *Colletotrichum kahawae* de la localidad Gera. Incremento relativo de la absorbancia ($wv/\lambda = 350 \text{ nm}$) de los medios de cultivos luego de ser centrifugados y filtrados respecto a su respectivo tratamiento control.

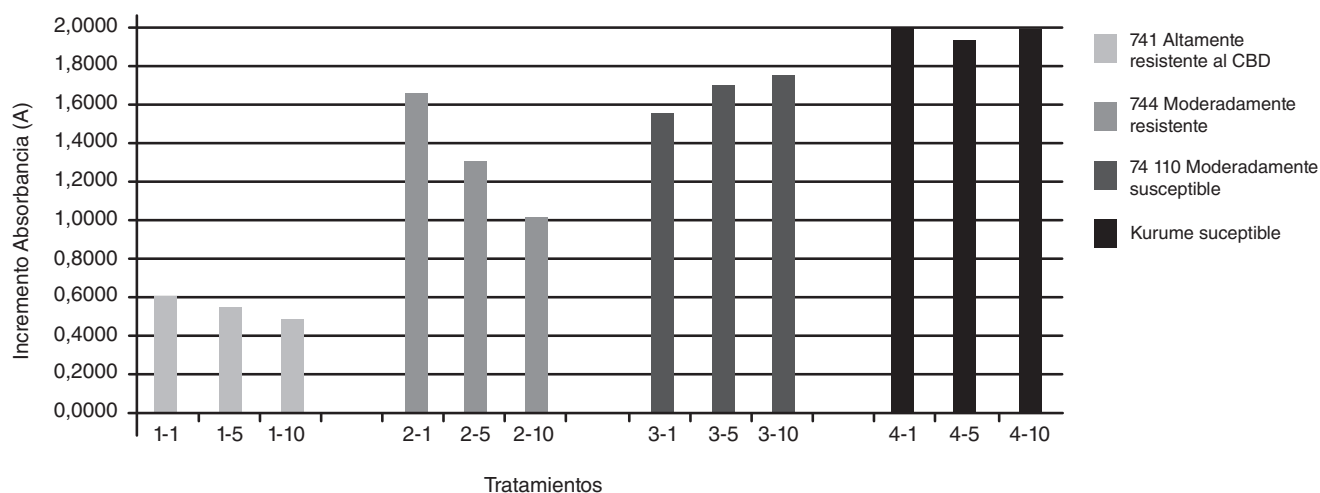


Fig. 3. Comportamiento de callos de los cuatro genotipos evaluados ante inoculaciones con filtrado estéril de *Colletotrichum kahawae* de la localidad Melko. Absorbancia ($wv/\lambda = 350 \text{ nm}$) de los medios de cultivos luego de ser centrifugados y filtrados respecto a su respectivo tratamiento control.

De acuerdo con Abdelwahd *et al.* (2008), en la etapa de establecimiento *in vitro* muchos de los explantes empiezan a perder el color e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes cultivados de tomate se ha reportado la presencia de vainilina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído.

Según Shao *et al.* (2008), las plantas producen activamente ROS como moléculas señalizadoras de diferentes vías y procesos metabólicos, controlando actividades normales del crecimiento y desarrollo, así como regulación de la expresión génica asociada a estrés biótico y abiótico para fortalecer el sistema de defensa contra patógenos.

Son disímiles los factores que pudieran desencadenar la producción de fenoles en el cultivo de tejidos vegetales. Quirós *et al.* (2010) obtuvieron en la formación de callos, a partir de hojas jóvenes de cacao, un mayor contenido de fenoles solubles cuando no se utilizó ácido indol-butírico, mientras que la mayor concentración de fenoles ligados a la pared y totales la registraron para la mayor concentración de hormona.

Sánchez *et al.* (2010) observaron 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 fue mayor en plantas de Calcutta 4 respecto a las de Grande naine. Se demostró que la acumulación de estos compuestos bioquímicos está relacionada con la respuesta defensiva de la planta ante la inoculación del patógeno en ambos genotipos. Estos resultados ofrecen además nuevas evidencias de los mecanismos de defensa de la planta en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*.

Biratu (1997) reportó que semillas de cafetos resistentes al CBD en Etiopía y cultivares en Kenya tenían un contenido de cafeína más alto que las susceptibles.

Conclusiones

- Es posible la formación de callos a partir de hipocótilos de las selecciones de café 741 altamente resistente al CBD, 744 moderadamente resistente al CBD, 74 110 susceptible al CBD y kurume susceptible al CBD.
- Callos de los genotipos resistentes respondieron diferente a los de genotipos susceptibles en cuanto a coloración, al aplicar el extracto filtrado estéril de *Colletotrichum kahawae*, modelo que puede ser usado para diferenciar genotipos susceptibles de resistentes a antracnosis.

Bibliografía

- Abdelwahd, R; Hakam, N; Labhilili, M. and S. UduPa: Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002, 2008
- Arega, Zeru: "Diversity of Arabica Coffee Population in Afromontane Rain Forests of Ethiopia in relation to *Colletotrichum kahawae* and *Gibberella xilaroides*" [inédito], tesis de candidatura. Addis Ababa University. 2006.
- Azofeifa, Álvaro: Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175, 2009.
- Biratu, T.: "Studies on *Colletotrichum* population of *Coffea arabica* L. in Ethiopia and evaluation of the reactions of coffee germplasms" [inédito], tesis de candidatura. University of Bonn, Germany. 1995.
- Biratu, T.: Effects of caffeine on coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*). *ASIC* 17:727-733, 1997.
- De García, Eva G. y Margarita Rafael: Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. 'Catimor') a partir de microesquejes cultivados in vitro* Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias. Centro de Botánica Tropical. Apdo. 47114. Caracas 1041. Venezuela. 1989.
- Isaac Alemán, Elizabeth; Mboghli, Andrew; González-Olmedo, Justo; Yilan Fung Boix; Azanza, Guillermo y Carlos Aragón: Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas in vitro de cafeto bajo un campo electromagnético. En: IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL 20 - 22 de abril de 2010. IBP, Cuba. 2010.
- Orozco, S.; F.; Hoyos S., R. y M. Arias Z.: Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 55, (1):1473-1495, 2002.

- Plant Pathology Department (PPD): Antracnose. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Original publication date June 1994. Reviewed April 2003. Visit the EDIS Web Site at <http://edis.ifas.ufl.edu>. Pp. 136, 2003.
- Pompeu, G.; Gratão, P.; Vitorello, V. y R. Azevedo: Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Ciencia Agrícola* 65: 548-552, 2008.
- Quirós, Y.; Quiñones, J.; Trujillo, R.; Augustine, T.; Capdesuñer, Y.; Borroto, J. y M. Hernández: Contenido de fenoles en callos provenientes de hojas de *Theobroma cacao* L. En: *IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL 20 - 22 de abril de 2010*. IBP, Cuba. 2010.
- Rojas, Luis; Portal, Orelvis y Elio Jiménez: Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotechnología Vegetal* 11(4): 213 – 222, 2011.
- Sánchez-García, Cynthia; Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín; Leiva-Mora, Michel y Berkys Roque: Respuesta histoquímica defensiva en plantas de dos genotipos de *Musa* spp. Inoculados artificialmente con *M. fijiensis*. En: *IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL 20 - 22 de abril de 2010*. IBP, Cuba. 2010.
- Shao, H. B.; Chu, L. Y.; Shao, M. y A. Cheruth: Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *c.r. Biologies* 331:433-441, 2008.

