

# EFFECTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Ceratocystis fimbriata* SOBRE EL CONTENIDO PROTEÍNICÓ Y EL COMPORTAMIENTO ENZIMÁTICO DE CALLOS DE EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea arabica* cv. Típica Y Borbón

María Elena Ocampo\*, Jairo Leguizamón-Caycedo\*\*, Yamel López -Forero\*\*\*

---

## RESUMEN

OCAMPO A., M.E.; LEGUIZAMÓN C., J.E.; LÓPEZ F., Y. Efecto de metabolitos secundarios de *Ceratocystis fimbriata* sobre el contenido proteínico y el comportamiento enzimático de callos de explantes foliares de *Coffea arabica* c.v. Típica y Borbón. *Cenicafé* 51(3): 216-223. 2000.

Se estudió el efecto de una mezcla de metabolitos secundarios aislados de *Ceratocystis fimbriata* sobre la concentración de proteínas, la actividad enzimática y el crecimiento de callos de tejido foliar de *Coffea arabica* de las variedades Típica, Borbón rojo y Borbón resistente a *C. fimbriata*. El hongo se aisló en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y el micelio y los metabolitos secundarios se obtuvieron en medio líquido sintético ZMA. Los callos de *C. arabica* se obtuvieron de explantes foliares de árboles seleccionados de la Estación Experimental de Naranjal (Chinchiná, Colombia), cultivados en medio de Murashige-Skoog modificado (LIQC primario) y subcultivados en medio LIQC secundario cada quince días. Los resultados muestran que los callos provenientes de la variedad Borbón RM (resistente) presentan un mayor peso final en comparación con los de la variedad Borbón rojo susceptible, mientras que la concentración de proteína es mayor en la variedad susceptible que en la resistente. Las pruebas electroforéticas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes evidencian actividad de las esterasas y de la fosfatasa ácida en las variedades susceptibles, mientras que en la variedad resistente no se evidencia actividad de tales enzimas.

**Palabras claves:** Café, *Coffea arabica*, *Ceratocystis fimbriata*, callos, resistencia, susceptibilidad, esterasa, fosfatasa ácida, electroforesis.

---

## ABSTRACT

The effect of a mixture of secondary metabolites isolated from *Ceratocystis fimbriata* on the protein concentration, enzymatic activity, and the growth of leaf tissue callus of *Coffea arabica* cultivars Típica, red Borbón, and Borbón resistant to *C. fimbriata*, was evaluated. The fungus was isolated in PDA and secondary metabolites were produced in liquid medium ZMA. *C. arabica* calli were obtained from leaf explants of trees selected from the Experimental Station Naranjal (Chinchiná, Colombia), and were cultured in modified Murashige-Skoog medium (primary LIQC) and subcultured in secondary LIQC every 15 days. Results indicate that calli from Borbón cultivar (resistant) had a higher final weight, whereas final protein concentration was higher in susceptible cultivars than in the resistant. Electrophoretic analyses in native polyacrylamide gels evidenced activity of esterases and acid phosphatase in the susceptible cultivars, whereas in the resistant there is no evidence of such enzymatic activity.

**Keywords:** Coffee, *Coffea arabica*, *Ceratocystis fimbriata*, callus, resistance, susceptibility, esterase, acid phosphatase, electrophoresis.

---

\* Bacterióloga. Universidad Católica de Manizales

\*\* Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

\*\*\* Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira

La lucha contra las enfermedades de las plantas constituye una de las prácticas agronómicas más importantes para la protección vegetal. Entre las enfermedades fúngicas del café, se encuentra la "llaga macana", un tipo de cáncer del tronco causado por el hongo *Ceratocystis fimbriata* Ell. Halst. Hunt. Éste es habitante del suelo y parásito facultativo que se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, donde ha adquirido una importancia creciente debido a que la infección ocurre principalmente por la vía de las heridas causadas al deschuponar y zoquear el cafeto. La infección de los haces vasculares (xilema y floema) trae como consecuencia la muerte celular y la suberización de los tejidos, que dan lugar a las necrosis, debido a que las células parasitadas pierden su turgencia y la capacidad de intercambio dentro de la planta. Como consecuencia, se presenta escaso brotamiento de yemas, clorosis, marchitamiento, pérdida de follaje y muerte de chupones (7).

Las variedades comerciales de café, Borbón, Típica, Colombia y Caturra son susceptibles a la enfermedad y su control se basa en la aplicación preventiva de fungicidas durante la época de zoqueo y durante la selección de brotes (9). Para lograr obtener formas de control más eficaces que las utilizadas en el momento, es necesario acometer el estudio de los mecanismos implicados en los procesos de resistencia. Para tal efecto se debe conocer el comportamiento proteínico de las plantas susceptibles y tolerantes y por último, la asociación planta-microorganismo, lo cual puede contribuir al conocimiento del comportamiento genético de las variedades y su relación con la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, en Chinchiná, ubicado a 5° 00' N 75° 36' W, a 1400msnm

y un promedio de temperatura de 24°C. Las muestras foliares (hojas jóvenes del primer y segundo par de ramas plagiotrópicas y ortotrópicas) se tomaron de cafetos de la var. Típica (susceptible), Borbón rojo (susceptible) y Borbón RM (resistente) cultivados en la Estación Cental Naranjal y se colocaron en cámara húmeda hasta la siembra de los explantes, el mismo día de la recolección.

El material foliar se lavó con Teepoll-Shell al 1% V/V, se enjuagó 4 veces con agua destilada y luego se desinfectó con hipoclorito de sodio 2,5% durante 20min. El desinfectante se eliminó lavando el material con agua bidestilada estéril cuatro veces consecutivas. Posteriormente, se realizaron cortes de tejido internerval de 0,5-1,0cm de lado.

**Siembra.** Los explantes se colocaron en cajas de Petri que contenían 30ml de medio primario de inducción Murashige-Skoog modificado (medio LIQC) y se incubaron en la oscuridad a 28°C hasta observar la presencia de callos (2).

**Cuantificación de proteínas en callos de tejido foliar.** Se maceraron con N líquido 0,8g de tejido de callo de tercera generación (4 meses de edad), en una relación peso/volumen (1/2) obtenidos de cultivos realizados en medio LIQC secundario y la proteína soluble total se extrajo con buffer de extracción Robinson modificado (Tris - HCl 0,05M; pH=8,0, 20% sucrosa, 5% PVP-40, 0,5% Tritón X-100 y 0,001M  $\beta$ -mercaptoetanol) (14). El macerado se filtró en una capa de gasa y una de muselina y el filtrado se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf 541 C a 12000rpm durante 8min, a 4°C. El sobrenadante (1ml) se cargó en una columna Econopac de BioRad y se eluyó con buffer Hapes-KOH 0,1M de pH=7,5; 0,0005MEDTA; 0,01M acetato de magnesio; 0,005M DIECA 0,05% Tritón X-100, 5% glicerol y 0,02M  $\beta$ -mercaptoetanol. El eluido sin signos de fenolización se congeló a -20°C hasta su utilización.

**Aislamiento y multiplicación de *C. fimbriata* a partir de tejido infectado de café.** Se seleccionaron troncos infectados de la variedad Caturra, se descortezaron y se lavaron con una solución jabonosa (Axion) 1/10 y se enjuagaron con agua corriente durante 1 hora. Luego se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente durante 7 días hasta la observación de peritecios de *C. fimbriata*. Los peritecios obtenidos se utilizaron para inocular tallos tiernos descortezados de café variedad Caturra, lavados con agua corriente, y secados y desinfectados con una solución 5% de hipoclorito de sodio en una cámara de flujo laminar. Se inocularon tres ascosporas por cada tallo tierno y se dejaron a temperatura ambiente hasta que se observó la producción de abundantes peritecios y ascosporas (8 días en promedio) (11).

Las estructuras del hongo provenientes de los tallos infectados se inocularon en cajas de Petri con medio de cultivo agar-V8 y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 mes hasta obtener crecimiento de las estructuras fúngicas. Luego se suspendieron trozos de agar infectado en 55ml de agua esterilizada y se homogeneizaron. De esta suspensión se inoculó 1ml en medio ZMA y se incubó durante 21 días en un agitador rotatorio a 2.025Hz. El cultivo cambió de hialino a blanco a los 5 días y a color negruzco entre los 12 y 21 días, período que es el más favorable para la extracción de los metabolitos secundarios (13).

Una parte de las estructuras miceliales se separó mediante filtración en Millipore con filtros de papel estériles y se liofilizó, y la otra se resuspendió en buffer de extracción, se filtró, se centrifugó a 10000g durante 10min y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se inoculó entonces 1ml de la suspensión celular del hongo en 30ml de medio caldo de papa-dextrosa con 60ml de ampicilina (solución alcohólica 40 % W/V), se incubó durante 12 días en rotación y se filtró en Millipore con filtros estériles de celulosa. El micelio obtenido se resuspendió en 4ml de buffer de Palmer

modificado Tris-HCl 0,05M de pH=8,0; 0,35M sorbitol, 0,005M EDTA; 0,005M b-mercaptoetanol y 3% W/V PVP-40 (16).

**Estudio electroforético de proteínas totales y de las enzimas esterasa y fosfatasa ácida de callos de tejido foliar.** Se realizaron electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) del 7,5%. La actividad isoenzimática de esterasa y fosfatasa ácida se estudió electroforéticamente en geles no desnaturalizantes de acrilamida del 7,5% (5,0 $\mu\text{g}$  y 3,0 $\mu\text{g}$  prot. total/pozo) utilizando un buffer de electrodo Tris-borato 0,1M de pH=9,0 bajo 100V y 60mA a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas. Para la actividad de esterasa el gel se incubó a temperatura ambiente durante 10min. en presencia de buffer fosfato 0,25M de pH=6,0.

La actividad enzimática se detectó mediante una mezcla de 0,1g de  $\alpha$ -naftil acetato y 0,05g de  $\beta$ -naftil acetato diluidos en 2ml de acetona y 1ml de agua destilada en 100ml del buffer de tinción. Los geles se incubaron en la mezcla durante 45min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de la aparición de las bandas pardas, los geles se fijaron con una solución ácido acético, metanol, agua (1:6:14) (17).

La fosfatasa ácida se detectó sumergiendo el gel en 100ml buffer acetato 0,05M de pH=5,0, con  $\alpha$ -naftil acetato (50mg),  $\text{MgCl}_2$  (50mg) y Fast Garnett Salt Blue (50mg) (3:14:19).

**Efecto de la mezcla de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de los callos.** Se incubaron 5 trozos de 0,5g de callo, de 4 meses de edad procedentes de explantes de hojas de Borbón rojo (susceptible) y Borbón RM (resistente) en 50ml de medio líquido primario (60 erlenmeyers/variedad) con 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0ppm de mezcla de metabolitos secundarios parcialmente purificados de *C. fimbriata* proveniente de un cultivo en medio ZMA. Los callos, sin oxidación aparente al momento de iniciación

del ensayo, se colocaron a 28°C en la oscuridad durante 28 días (12). El contenido de proteína soluble total se midió mediante el método de Bradford (5) En otro ensayo se incubaron los callos durante 12 días con 5ml de acetato de amilo (0,0 a 1,0ppm) y se observaron los cambios morfológicos durante 8 días (4).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aislamiento de *Ceratocystis fimbriata* a partir de tejido infectado de café.** La presencia del hongo y su crecimiento pueden detectarse mediante los cambios de color del medio ZMA durante el período de incubación. Luego de 12 días de crecimiento se desprendió un olor que parece corresponder al acetato de amilo (esencia de banano), lo cual es un indicativo de la mayor producción de metabolitos secundarios por el hongo (13).

Luego de los 12 días se alcanza el fin de la fase de crecimiento exponencial (13). En la Figura 1 se pueden observar los cambios de coloración del medio sintético ZMA, por la producción de metabolitos secundarios de *C. fimbriata*.



**Figura 1.** Cambios de coloración del medio sintético ZMA por la producción de metabolitos secundarios de *Ceratocystis fimbriata*.

**Producción de callos.** La formación de callos se inició en las venas secundarias y continuó hacia las células mesenquimatosas del borde de la lámina foliar. La adhesión del explante al medio de cultivo aceleró el crecimiento celular y la formación de callos de diferente textura, probablemente debido a una mejor exposición de las células del mesófilo esponjoso a los nutrientes del medio (12). En la Figura 2 se observa cómo los callos de la variedad Típica de 1 mes de edad presentan un buen crecimiento con zonas bien diferenciadas de tejido friable de color crema brillante que con los medios adecuados normalmente puede presentar un alto grado de diferenciación. Los callos provenientes de Borbón rojo y Borbón RM fueron de consistencia compacta, poco friables, con proliferación celular reducida y con síntomas de oxidación alrededor del explante.

**Comportamiento proteínico.** Se logró la eliminación de los fenoles en los extractos con la combinación del buffer de extracción Robinson modificado ( HEPES-KOH 0,1M, pH=7,5; 0,0005M EDTA; 0,01M Mg acetato; 0,005M DIECA; 0,05% Tritón X-100 V/V, 5% glicerol, 5% PVP-40 W/V y 0,02Mβ-mercaptoetanol) y filtración de la muestra en una columna Econopac

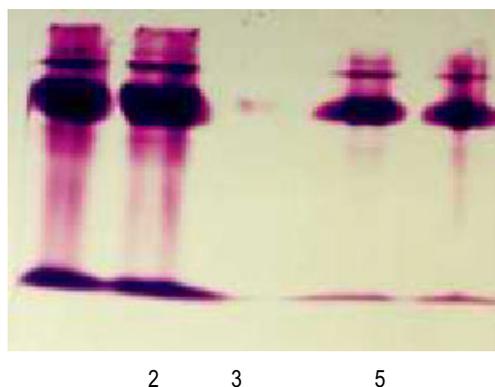


**Figura 2.** Callos de un mes de edad obtenidos a partir de explantes foliares de *C. arabica* cv. Típica.

de BioRad. Según Budiani (6), las altas concentraciones de compuestos fenólicos interfieren con la extracción de proteínas de tejido foliar de café. El empleo de PVP-40 impide la actividad de la polifenol oxidasa lo mismo que el metabisulfito de sodio, evitando la formación de los polifenoles y la oxidación de los fenoles a quinonas que se combinan irreversiblemente con las proteínas. De igual forma los agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol previenen la formación de fenoles (14).

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de la comparación de medias de la concentración de proteína de células en suspensión y callos provenientes de las variedades Típica, Borbón rojo y Borbón RM mediante la prueba t de Student. Los resultados permiten sugerir ( $P < 0,01$ ) que las variedades susceptibles a *C. fimbriata* (Típica y Borbón rojo) tienen una mayor concentración de proteína en los callos en comparación con la variedad resistente Borbón RM.

**Comportamiento electroforético de las proteínas totales de callos.** La Figura 3 muestra los resultados de la comparación electroforética



**Figura 3.** Comportamiento de las proteínas totales de extractos de callo de *C. arabica* cv. Típica (susceptible) [1, 2 (5µg prot total/pozo) ; 5, 6 (3µg prot total/pozo)] y Borbón RM (resistente) [3,4 (5µg prot total/pozo)].

(PAGE-SDS) de proteínas totales (5mg y 3mg de proteína total/pozo) de muestras de callos de Típica (susceptible) y Borbón RM (resistente). Como se puede observar, el patrón de bandas de la variedad susceptible a la llaga macana es diferente al de la variedad resistente (Borbón RM). Este resultado confirma los resultados de la comparación de la concentración de proteínas en los callos provenientes de los dos tipos de

**TABLA 1.** Comparación de concentración de proteínas expresada en µg/ml entre las variedades Borbón rojo (susceptible) y Típica (susceptible) analizadas por medio de la prueba t-Student.

Variedad	n	Media	Desviación estándar	Error estándar	p>t
Borbón rojo	14	26,12	4,339	1,1596	0,0081
Típica	14	30,95	4,571	1,221	

**TABLA 2.** Comparación de la concentración de proteína expresada en µg/ml presente en las variedades Borbón rojo (susceptible) y Borbón RM (resistente) analizada por medio de la prueba t-Student.

Variedad	n	Media	Desviación estándar	Error estándar	p>t
Borbón rojo	13	25,66	4,423	1,226	0,0001
Borbón RM	13	14,48	2,163	0,600	

variedades y parece sugerir que la susceptibilidad al patógeno está asociada a una mayor cantidad de péptidos y, probablemente, a diferentes tipos de péptidos en la variedad susceptible. Probablemente el mecanismo de susceptibilidad está asociado a una mayor y diferente síntesis de glucoproteínas de reconocimiento, tanto al nivel de pared como de membrana celular de la variedad susceptible (15).

**Actividad de esterasa.** La Figura 4 muestra el resultado de la comparación de la actividad de esterasa de extractos de callos de 4 meses de edad de tejido foliar de las variedades Típica (susceptible) y Borbón RM (resistente). La variedad susceptible presenta un claro patrón de bandas, mientras que en la variedad resistente tal patrón no pudo ser observado. Esto se debe, probablemente, a que el nivel de expresión de la esterasa en las variedades susceptibles es mayor que en la variedad resistente. Lo anterior parece reconfirmar el resultado de la comparación de proteínas totales en el extracto de callo de las dos variedades. Además, es posible que la patogenicidad de *C. fimbriata* esté asociada a una mayor actividad de rompimiento de enlaces éster por el complejo isoenzimático de la esterasa.

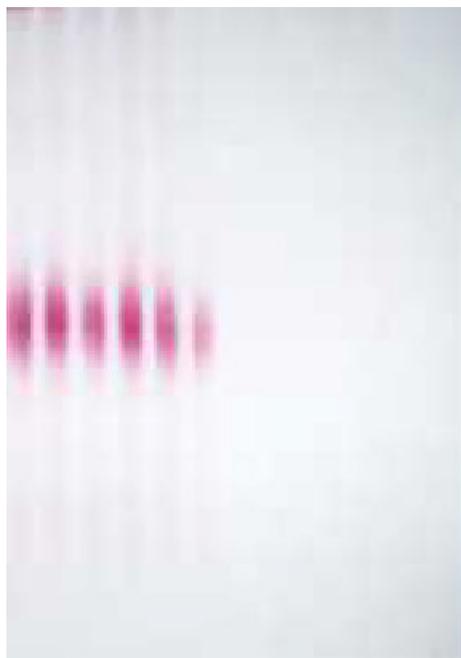
**Actividad de la fosfatasa ácida.** La Figura 5 muestra el comportamiento de la fosfatasa ácida presente en extractos de tejido de callo procedente de explantes foliares de las variedades Borbón RM (resistente) y Típica (susceptible) cuando se comparan mediante PAGE no desnaturizante de una cantidad igual de proteína total (5µg) en cada pozo del gel. Como en el caso de la esterasa, la variedad susceptible muestra la presencia de bandas, mientras que la resistente no. Probablemente, al igual que en el caso anterior, la respuesta se puede deber a diferencias en la síntesis de proteínas totales y a diferencias de síntesis de isoenzimas específicas.

**Efecto del acetato de amilo sobre el crecimiento de callos de tejido foliar de *C. arabica*.** El acetato de amilo es uno de los múltiples



**Figura 4.** Comportamiento de la actividad de esterasa en geles de poliacrilamida no desnaturizantes del 7,5%, a partir de extractos protéicos de callos provenientes de explantes foliares de *C. arabica* cv. Típica (susceptible) y Borbón RM (resistente).

metabolitos secundarios producidos por *C. fimbriata* que parecen tener un efecto tóxico sobre los tejidos de la planta afectada (13). En la Figura 6 se muestra el efecto de varias concentraciones de acetato de amilo (entre 0,0 y 0,8ppm) sobre el crecimiento de callos de tejido foliar de la variedad Borbón (susceptible). Como se puede observar, las concentraciones entre 0,4 y 0,8ppm de acetato de amilo indujeron necrosis en los callos de la variedad Borbón rojo, mientras que las mismas concentraciones no ocasionaron ninguna reacción adversa en los tejidos de callo foliar de la variedad Borbón RM. Los resultados sugieren que el acetato de amilo es uno de los compuestos segregados por *C. fimbriata* que exhibe mayor actividad fitotóxica sobre los tejidos de las variedades susceptibles.



2 3 5 7 9

**Figura 5.** Actividad de la fosfatasa ácida en geles no desnaturizantes de poliacrilamida del 7,5% (1, 2, 3, 4, 5, 6), extracto proteínico de callos de Típica (susceptible) (7, 8, 9, 10, 11), extracto proteínico de callos de Borbón RM (resistente).

**Efecto de la mezcla de metabolitos de *C. fimbriata* sobre el crecimiento de callos de tejido foliar de las variedades Borbón rojo (susceptible) y Borbón RM (resistente).** El análisis de covarianza no muestra efecto del peso inicial de los callos sobre el peso final, lo cual quiere decir que la disminución del peso con el aumento de la concentración de los metabolitos del hongo es debida únicamente al efecto tóxico de las concentraciones crecientes de ellos.

El análisis de regresión permite establecer que el efecto fitotóxico de la mezcla de metabolitos sobre los callos foliares de Borbón rojo es lineal ( $Y=0,6141 - 0,2729X$ ,  $r^2=0,98$ ) y mayor que el efecto sobre los callos foliares de Borbón RM cuya respuesta es de tipo cúbico ( $Y=0,649 - 0,061X + 0,523X^2 - 0,714X^3$ ,  $r^2=0,91$ ). Como se puede observar, en ambos casos el aumento de las concentraciones de la mezcla de metabolitos produce la disminución del crecimiento de los callos, pero con mayor proporción en los callos de Borbón rojo. A concentraciones bajas no hay efecto evidente de la mezcla sobre los callos de Borbón RM. Este resultado es una muestra de la tolerancia de los callos de Borbón RM. A concentraciones mayores de 0,5ppm se produce en ambos casos un



**Figura 6.** Efecto de varias concentraciones de acetato de amilo (entre 0,0 y 0,8ppm) sobre el crecimiento de callos de tejido foliar de la variedad Borbón rojo (susceptible).

2

efecto drástico sobre el crecimiento, aunque ligeramente menor en Borbón RM. Estos resultados parecen sugerir que las concentraciones de los metabolitos fitotóxicos de la mezcla, tienen un efecto menor sobre el crecimiento de los tejidos de las variedades resistentes o tolerantes a la infección por *C. fimbriata* en comparación con el efecto sobre los genotipos susceptibles.

## AGRADECIMIENTOS

Al señor Hernando García de la disciplina de Biometría de Cenicafé.

## LITERATURA CITADA

1. AGRIOS, G.N. Manual de enfermedades de las plantas. V. 3. México, Grupo Noriega Editores, 1991. 580 p.
2. APONTE, M.E. Embriogénesis somática inducida por cultivo en medios únicos en genotipos seleccionados derivados del cruzamiento *C. arabica* var. Caturra x H. de Timor. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. Cenicafé. Informe anual de la Disciplina de Biotecnología 1992 Chinchiná, Cenicafé, 1992.
3. BARKA, T. A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. Nature 187: 248-255. 1960.
4. BEHNKE, M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistance to culture filtrates of *Phytophthora*. Theoretical and applied genetics. 56: 151-152. 1980.
5. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72:248-254. 1976.
6. BUDIANI, A. Ekstraksi protein dan isoenzim esterase dari daun kopi. Menara Perke Bunan 57(4): 94-98. 1989.
7. CASTAÑO, J. J. Patogenia y epifitología en el estudio de la Llaga Macana del café. Cenicafé (Col) 4 (39): 17-24. 1953.
8. CASTILLO, J. Producción de variedades de café. Chinchiná, Cenicafé, 1977, 6p.
9. CASTRO C., B. L.; ZAPATA G., A. Control químico de la llaga macana *C. fimbriata* Ell. Halst. Hunt. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitopatología, 9. Pasto, 1988. p.70-71.
10. FOSKET, D.E. Plant growth and development: A molecular approach. San Diego, Academic Press, 1994. 580 p.
11. FERNÁNDEZ, O. Patogenicidad de *C. fimbriata* (Ell Halst.) Hunt y posible resistencia en *Coffea arabica*. L. var. Borbón. Cenicafé 15 (1): 3-17. 1964.
12. GENGENBACH, B. G.; GREEN, C. E. Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *H. maidis* race T pathotoxin. Crop Science 16:465-470. 1975.
13. GREMAUD, G. Isolement et identification de metabolites secondaires de *Ceratocystis fimbriata* var. *Coffea*. champignon parasite du chancre. Neuchatel, Universite de Neuchatel, 1994. p. 167-180. (These: Doctorat.).
14. HUSSAIN, A.; RAMÍREZ, H.; ROCA, W. M., Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. Cali, CIAT, 1986. 67 p. (Documento de trabajo).
15. KARP, G. Biología celular. México, McGraw-Hill. 1996. p. 126-132.
16. PALMER, J.D. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. In: WEISSBACH, A.; WEISSBACH, H. eds. Methods in enzymology. Vol 118. Plan molecular biology. Orlando, Academic Press, 1986. p. 167-186.