

Área de Biotecnología Vegetal y Fitopatología

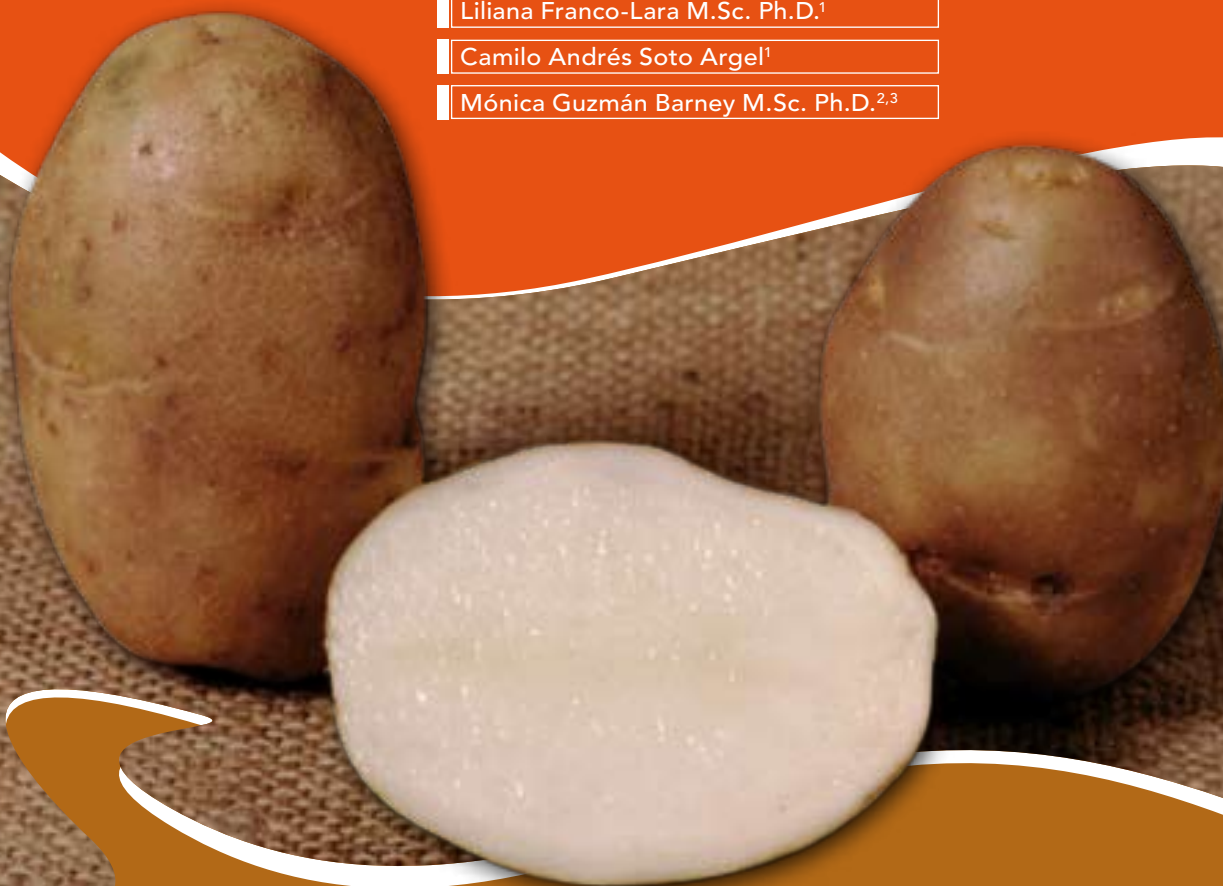
# DETECCIÓN DE LOS VIRUS PVX, PVS, PVY Y PLRV EN LA COLECCIÓN CENTRAL COLOMBIANA DE PAPA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE INMUNOIMPRESIÓN (IMI)

DETECTION OF VIRUS PVX, PVS, PVY AND PLRV IN THE COLOMBIAN CENTRAL COLLECTION OF POTATO BY THE TISSUE PRINTING TECHNIQUE

Liliana Franco-Lara M.Sc. Ph.D.<sup>1</sup>

Camilo Andrés Soto Argel<sup>1</sup>

Mónica Guzmán Barney M.Sc. Ph.D.<sup>2,3</sup>



Recibido el 27 de agosto de 2009

Aceptado el 9 de octubre de 2009

1. Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
2. Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.
3. Autor para correspondencia: mmguzamanb@unal.edu.co

## RESUMEN

La técnica serológica de inmunopresión (IMI) fue empleada para la detección de los virus PVX, PVS, PVY Y PLRV en una muestra de 44 accesiones de la Colección Central Colombiana de Papa (CCCP), correspondiente a 34 materiales de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, 4 de *Solanum phureja* y 6 de *S. chaucha*, mantenidos en campo en la Hacienda experimental Tibaitatá-CORPOICA. Se encontró que de las accesiones muestreadas 27 fueron positivas para PVS (61.3%), 17 para PVY (38.7%), 11 para PLRV (25%) y 9 para PVX (20.4%). Además, en 30 accesiones se detectó la presencia de más de un virus. Solo muestras de cinco accesiones de la especie *S. tuberosum* subsp. *andigena* se encontraban libres de virus. Aunque la muestra evaluada fue pequeña, se concluye que la técnica IMI fue adecuada para evaluar estos virus en la colección y que las condiciones fitosanitarias actuales de la CCCP no son óptimas para el mantenimiento de material vegetal *in vivo*, y prende las alarmas para que las instituciones encargadas de la preservación de este material implementen estrategias que permitan la erradicación de los virus del material en campo y el monitoreo permanente de la colección, con el fin de preservar estos importantes materiales de papa para el futuro.

**Palabras clave:** Papa, *Solanum tuberosum*, *Solanum phureja*, *Solanum chaucha*, PVX, PVY, PLRV, PVS

## ABSTRACT

The tissue printing serologic technique (IMI) was used for detection of PVX, PVS, PVY and

PLRV virus in a sample of 44 accessions from the Colección Central Colombiana de Papa (Central Colombian Potato Collection (CCCP)). Samples were taken from 34 materials of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, 4 of *Solanum phureja* y 6 of *S. chaucha*, maintained in the field at Hacienda Experimental Tibaitatá-CORPOICA. From the tested accessions, 27 were positive for PVS (61.3%), 17 for PVY (38.7%), 11 for PLRV (25%) and 9 for PVX (20.4%). Additionally, in 30 accessions the presence of more than one virus was detected. Samples of only five accessions of the *S. tuberosum* subsp. *andigena* species were virus free. Although the sample was small, the present phytosanitary conditions of the CCCP are not optimal for maintaining plant material *in vivo*. It turns on the alarm for the institutions responsible for these materials to implement strategies to eradicate the virus from the field material and to screen permanently the collection, for the preservation of these important potato materials for the future.

**Keywords:** Potato, *Solanum tuberosum*, *Solanum phureja*, *Solanum chaucha*, PVX, PVY, PLRV, PVS

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum spp.*) cumple un importante papel en la dieta humana pues provee parte de los requerimientos energéticos y nutricionales de las poblaciones rurales de muchos países americanos, además de ser una industria de importancia en países como en Norteamérica y Europa. En los últimos años, la producción de papa en los países desarrollados, especialmente en Europa y en la Comunidad de Estados Independientes, ha disminuido

en promedio un 1 por ciento al año. Sin embargo, la producción en los países en desarrollo ha aumentado a una tasa promedio del 5 por ciento anual, especialmente en China e India (FAO, 2008). En Colombia, este cultivo es la principal actividad agrícola de las zonas andinas y representa el sustento de más de 90.000 familias, principalmente en Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia (Cevipapa, 2004). La economía y el diario vivir de la población colombiana está ligada con la producción, comercialización y consumo de la papa.

La papa es originaria de Suramérica y se cree que fue domesticada por aborígenes de las culturas que se establecieron en la altiplanicie andina, en los territorios que hoy pertenecen a Perú y Bolivia, hace aproximadamente 7,000 años. Probablemente *Solanum tuberosum* fue domesticada a partir de la especie diploide *S. stenotomum* al hibridarse con *S. sparsipilum* y otras especies silvestres de papa, para generar la subespecie *andígena*, la cual evolucionó para producir la subespecie *tuberosum* (Hawkes, 1990). La papa fue llevada a Europa por los conquistadores europeos más como una curiosidad botánica, que como una planta alimenticia. Desde allí, el cultivo de papa se distribuyó a Europa y Norte América, cuyos países se convirtieron en grandes cultivadores de variedades de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. En los países andinos, la producción se mantiene como un renglón importante de la economía, principalmente en Perú, Brasil, Argentina y Colombia (FAO, 2008). A partir de la década de 1960, el cultivo de papa ha ido extendiéndose a por los países de Asia (particularmente China e India) y África, hasta posicionarse como uno de los principales alimentos del ser humano (FAO, 2008).

Los recursos genéticos vegetales para la alimentación y agricultura son la base de la seguridad alimentaria global. Estos comprenden una diversidad de materiales genéticos tales como las variedades tradicionales, cultivares modernos, parientes silvestres de cultivos y otras especies silvestres. La diversidad genética proporciona a los cultivadores y mejoradores el material para el mejoramiento a través de selección y cruces, con el fin de generar nuevos y mejores cultivos, que se adapten a las cambiantes condiciones del ambiente, pestes y enfermedades (Kameswara Rao, 2004), así como a las exigencias del mercado. La infraestructura que permiten el mantenimiento de la diversidad genética son llamadas Bancos de Germoplasma; su misión consiste en ubicar, recolectar, conservar y caracterizar el germoplasma de materiales vegetales de interés, además de aportar conocimiento científico orientado a la optimización de la conservación y uso de estos recursos (Cerón et al., 2005). La Colección Central Colombiana de Papa (CCCP), manejada por CORPOICA – Tibaitatá, está conformada por 2.985 accesiones de variedades cultivadas y silvestres, conservadas en condiciones de campo, cuartos fríos e *in vitro*. Incluye INTRODUCCIONES de las especies *Solanum tuberosum* subespecie *andígena*; *S. tuberosum* subespecie *tuberosum*, *S. phureja*, *S. chaucha* y especies silvestres como *S. colombianum* y *S. estradae* (Cerón et al., 2005). Geográficamente representan regiones del país (Nariño, Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Caldas, Quindío y Sierra Nevada de Santa Marta) e INTRODUCCIONES de Perú, Bolivia, Ecuador, México, Argentina, Inglaterra, Escocia, Alemania, Holanda y Bélgica (Rivera et al., 2008).

Las técnicas serológicas para la detección de virus de papa, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e Inmunoimpresión (IMI) han sido utilizadas previamente para evaluar detectar virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Garnsey *al.*, 1993; Guzmán, 1998), el virus de enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) (Franco-Lara y Barker, 1999) y los virus PVX, PVY, PLRV y PVS (Guzmán *et al.*, 2002). La técnica de inmunoimpresión en membranas de nitrocelulosa es empleada para la detección de virus de forma fácil, rápida y económica. En esta, se generan impresiones de los fluidos del tejido vegetal sobre una membrana de nitrocelulosa. Para la detección de los virus se emplean anticuerpos específicos contra cada virus, los cuales son reconocidos a través de anticuerpos anti-idiotípicos conjugados con la enzima fosfatasa alcalina, que en presencia de un sustrato generan un precipitado violeta, indicando la presencia y localización del virus sobre la impresión del tejido vegetal (Guzmán *et al.*, 2002).

Este trabajo de iniciación científica se desarrolló dentro del marco de un proyecto de colaboración con el Laboratorio de Virus Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, financiado COLCIENCIAS, que busca determinar mediante métodos serológicos la prevalencia de PVX, PVY, PVS y PLRV en la CCCP, así como el desarrollo de un anticuerpo que permita en el futuro la detección serológica del virus PVV. En este trabajo se evaluó la presencia de cuatro virus (PVX, PVY, PVS y PLRV) en 44 accesiones de un total de cerca de 600, dentro de las que se incluyeron representantes de *S. tuberosum ssp. andígena*, *S. phureja* y *S. chaucha*,

por medio de la técnica de inmunoimpresión IMI. Se espera que los resultados de este proyecto contribuyan a la toma de decisiones para el manejo y mantenimiento de esta importante colección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Una parte de la CCCP que se mantiene en campo, está ubicada en CORPOICA-Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, a 2.600 m.s.n.m. Esta parte de la colección cuenta con aproximadamente 800 accesiones, cada una de las cuales está representada por una parcela con 12 a 15 plantas. El material empleado en este trabajo provenía de 44 accesiones correspondientes a material de campo. Se tomaron muestras foliares (tres plantas por accesión) representantes de las especies *S. tuberosum ssp. andígena*, *S. phureja* y *S. chaucha*. Se escogieron folíolos de plantas con síntomas tales como necrosis, enanismo, clorosis, moteado y enrollamiento de las hojas. El muestreo se realizó en junio de 2008.

La técnica IMI se implementó siguiendo la técnica de Guzmán (1994) y Guzmán *et al.*, 2002, en el Laboratorio de Virus Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Se prepararon cuatro membranas de nitrocelulosa Hybond C (Amersham), una para cada virus a evaluar, en donde se hicieron impresiones por duplicado, de cada una de las tres muestras por accesión evaluada. Las impresiones correspondían a cortes transversales de pecíolos. Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y después se trataron con solución de bloqueo (0.02M Tris, 0.5M NaCl, 0.5% albúmina

de suero bovino (BSA), 2% leche descremada), en agitación por 1 hora, a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron los anticuerpos primarios (Agdia) anti PVX, PVY, PVS y PLRV; cada anticuerpo en dilución 1:200 en TBS (Tris 0.02 M, NaCl 0.5M) con BSA al 0.5%. Las membranas se sumergieron en esta solución y se dejaron en agitación suave a 37°C por 3hr. Posteriormente, las membranas se lavaron TBS-Tween, tres veces por cinco minutos en agitación suave. Después del lavado las membranas fueron incubadas con el anti-anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina en dilución 1:200 en TBS, a 37°C por 1 hora y lavadas como se mencionó antes. Para el revelado se preparó una solución de nitro blue tetrasodium NBT (0.1mg/ml) y bromo cloro indol fosfato BCIF (0.05mg/ml) en buffer citrato (0.1M de Tris, 0.1M de NaCl, 10mM citrato y 5mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , pH 9.5). La membrana se sumergió en la solución de revelado de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente y una vez que se observó precipitación morada sobre la membrana se lavó con agua destilada para detener la reacción. Una vez secas, las membranas se observaron al estereomicroscopio. Las muestras se consideraron positivas cuando aparecía sobre la impresión un precipitado morado. No se emplearon controles positivos y negativos en este ensayo porque no se disponía de plantas que con seguridad tuvieran o no virus; entonces para comparación se emplearon impresiones anteriores obtenidas en el laboratorio de virus vegetales del IBUN, que contenían muestras positivas y negativas. Para considerar una accesión positiva para un virus, bastaba con que uno de los duplicados de una muestra procesada por IMI, fuera positiva.

## RESULTADOS

Se evaluaron por IMI muestras provenientes de 44 accesiones de la CCCP. De las accesiones evaluadas con anticuerpo anti-PVX nueve presentaron al menos una planta positiva para este virus (accesiones 1, 2, 4, 6, 29, 30, 32, 39, y 44), lo que corresponde a una prevalencia del 20.4%. En 89% de las accesiones positivas (ocho accesiones) dos plantas de las tres plantas evaluadas fueron positivas y solo una accesión tenía una planta positiva (Tablas 1 y 2).

*Para PVY, 17 de las 44 accesiones evaluadas 38.7% fueron positivas (accesiones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 15, 18, 22, 24, 28, 34, 42 y 43). En 29% (5 accesiones) de las accesiones positivas dos muestras eran positivas y las restantes 12 accesiones presentaban una sola muestra positiva (Tablas 1 y 2).*

El análisis para PLRV mostró que las accesiones 3, 4, 5, 12, 13, 15, 17, 18, 30, 40 y 41 presentaban precipitado morado localizado en los haces vasculares en al menos una planta, lo que corresponde a una prevalencia del 25% (Tablas 1 y 2). Esto es de esperarse teniendo en cuenta de que se trata de un virus obligado del floema. En 55% de las accesiones positivas, dos de las tres plantas muestreadas eran positivas y en 45% solo una de las plantas era positiva.

Para PVS, este estudio mostró que la prevalencia fue del 61.3%, pues de 44 accesiones 27 fueron positivas (1, 3, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 17, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42 y 43). En 23 de las accesiones que presentaban el virus, dos de las tres plantas evaluadas eran positivas y cuatro accesiones presentaban solo una planta infectada (Tablas 1 y 2).

Código en este trabajo	Número Ac- cesión	Número Colección	Especie	PVX	PVY	PRLV	PVS
1	16	155(016)	St a	2/3	1/3	0	1/3
2	22	198,1(022)	St a	1/3	2/3	0	0
3	35	268(035)	St a	0	3/3	2/3	3/3
4	038	308(039)	St a	2/3	1/3	1/3	3/3
5	53	1062(057)	St a	0	3/3	2/3	0
6	67	1569(072)	St a	1/3	1/3	0	3/3
7	99	3645(106)	St a	0	0	0	1/3
8	127B	4211(135)	St a	0	1/3	0	0
9	151	4251(159)	St a	0	1/3	0	0
10	171	4278(180)	St a	0	0	0	0
11	79	2261(085)	St a	0	0	0	3/3
12	87	2791(093)	St a	0	0	3/3	0
13	192	4315.1(201)	St a	0	1/3	3/3	1/3
14	196	4322(206)	St a	0	0	0	3/3
15	197	4323(207)	St a	0	1/3	1/3	2/3
16	206	4343.2(216)	St a	0	0	0	0
17	223	4368(233)	St a	0	0	3/3	3/3
18	248	4396(258)	St a	0	1/3	2/3	0
19	251	4403(261)	St a	0	0	0	0
20	257	4412(268)	St a	0	0	0	3/3
21	268	4430(280)	St a	0	0	0	0
22	278	4445(290)	St a	0	1/3	0	0
23	281	4451(293)	St a	0	0	0	0
24	292	4467(304)	St a	0	1/3	0	1/3
25	298	4474(310)	St a	0	0	0	1/3
26	314	4504.1(325)	St a	0	0	0	2/3
27	327	4527(339)	St a	0	0	0	2/3
28	351	4577(363)	St a	0	1/3	0	2/3
29	3	334A(3)	St a	2/3	0	0	0
30	28	1020(30)	St a	2/3	0	2/3	2/3
31	32	1141(34)	St a	0	0	0	1/3
32	46	1286(48)	St a	1/3	0	0	0
33	52	1418(54)	St a	0	0	1/3	1/3
34	86	Sin numero	St a	0	1/3	0	3/3
35	32	FDR 3(36)	Sph	0	0	0	1/3
36	51	Sin número	Sph	0	0	0	1/1
37	56	Sin número	Sph	0	0	0	2/3
38	69	Sin número	Sph	0	0	0	2/3
39	Cha47	Sin número	Sch	1/3	0	0	0
40	P595	Sin número	Sch	0	0	1/3	0
41	Cha 6	Sin número	Sch	0	0	1/3	1/3
42	Cha37	Sin número	Sch	0	1/3	0	2/3
43	Cha39	Sin número	Sch	0	1/3	0	1/3
44	Cha55	Sin número	Sch	1/3	0	0	0

**Tabla 1.** Relación del número de plantas infectadas con cada virus por especie y accesión

La relación que aparece en fraccionarios indica el número de plantas infectadas de un total de tres plantas evaluadas St a = *S. tuberosum* subsp. andigena, Sph = *S. phureja*, Sch = *S. chaucha*

Solo cinco accesiones fueron negativas para los cuatro virus evaluados. El virus más preveniente fue PVS, el cual fue detectado en 27 accesiones, solo o con los otros tres virus en combinaciones dobles, triples o cuádruples. El menos común fue PLRV que solo se registró en cuatro accesiones. La accesión 4 presentó plantas infectadas con los cuatro virus.

La Figura 1 presenta fotografías de membranas desarrolladas para cada uno de los cuatro virus evaluados. Sobre las impresiones, se observan puntos o manchas de precipitado de color morado que corresponden a sitios donde se encontraban los acúmulos virales. En los cortes que fueron positivos para PVX, PVY y PVS la distribución del precipitado morado cubría áreas amplias, indicando que estos virus no se alojan únicamente en un tejido de la planta, como es el caso de PLRV, que es un virus obligado del floema.

## DISCUSIÓN

La preocupación por la pérdida de los recursos genéticos ha promovido la acción nacional e internacional dirigida a la conservación de materiales valiosos para la alimentación y la agricultura. Una de las estrategias implementadas para este fin ha sido el establecimiento de bancos de germoplasma, cuyo principal objetivo es el mantenimiento de la diversidad genética que asegure la disponibilidad de los recursos con el fin de responder a las necesidades de diferentes usuarios (Kameswara Rao, 2004). El concepto de conservación de germoplasma demanda que los métodos de colección

capturen la máxima variabilidad y subsecuentemente, a través de técnicas de conservación y regeneración se minimicen las pérdidas a lo largo del tiempo (Astley, 1992).

Este trabajo está enmarcado dentro de uno mayor que pretende determinar la presencia de los virus PVX, PVY, PVS, PLRV y PVV en la CCCP mediante métodos serológicos, siendo este banco de germoplasma uno de los más importantes del país no solo por su tamaño sino por la importancia del material que se preserva en él. Por lo menos 39 virus y patógenos similares a virus han sido reportados infectando cultivos de papa (Jeffries, 1998), pero este estudio se enfoca en PVX, PVY, PVS, PLRV, por ser considerados a nivel mundial como los de mayor prevalencia y efecto en la disminución del rendimiento. A pesar de tratarse de una muestra de tamaño reducido, los resultados de este estudio son significativos. La técnica de IMI permitió demostrar que de las 44 accesiones muestreadas, 27 fueron positivas para PVS (61.3%), 17 para PVY (38.7%), 11 para PLRV (25%) y 9 para PVX (20.4%) (Tablas 1 y 2

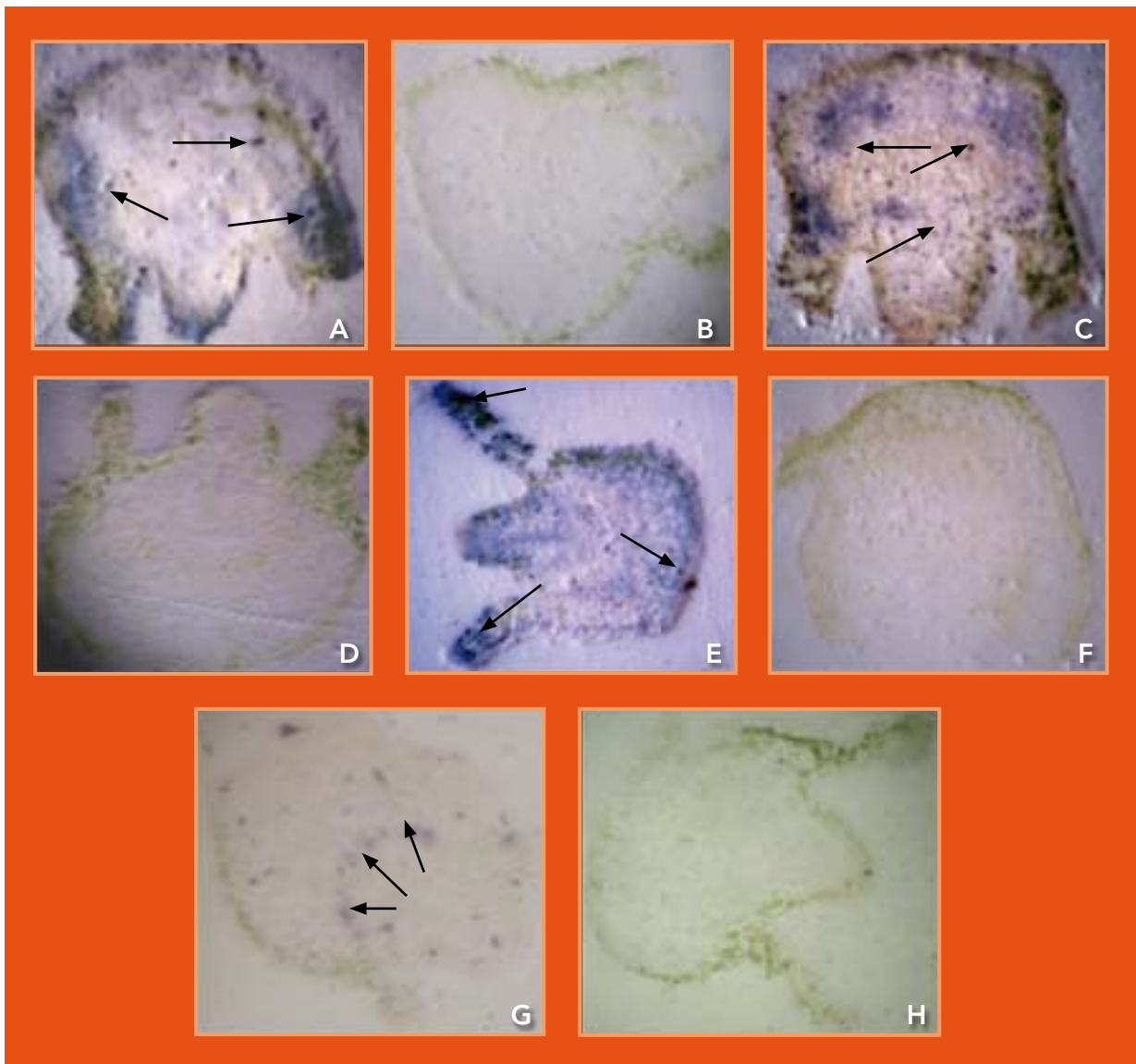
Las accesiones de la especie *S. tuberosum* subsp. *andigena* codificadas como 10, 16, 19, 21, 23 no presentaron evidencia de infección por ninguno de los virus evaluados. Es llamativo que

Virus	Plantas positivas /total muestreadas	Accesiones positivas /total muestreadas
PVX	11/132 (8.3%)	9/44 (20.4%)
PVY	24/132 (18.1%)	17/44 (38.7%)
PLRV	28/132 (21.2%)	11/44 (25%)
PVS	93/132 (70.4%)	27/44 (61.3%)

**Tabla 2.** Prevalencia de PVX, PVY, PLRV y PVS en 44 accesiones de la CCCP. Se consideró positiva una planta cuando al menos una de las impresiones por duplicado era positiva por IMI. Se consideró positiva una accesión cuando al menos una planta era positiva por IMI.

a pesar de estar expuestas a una alta presión de inóculo, aparentemente no fueron infectados, aunque no se descarta que estén contaminados con otros tipos virales. Otra posibilidad es que sean accesiones portadoras de genes

que les confieren tolerancia o resistencia a algunos o todos los virus estudiados. Este estudio debería extenderse a un mayor número de genotipos que son potencialmente portadores de genes de resistencia viral.



**Figura 1.** Cortes transversales de pecíolos o tallos de plantas positivas y negativas para cada uno de los virus estudiados. A. Muestra PVX positiva accesión 4; B. Muestra PVX negativa accesión 20; C. Muestra PVY positiva accesión 3; D. Muestra PVY negativa accesión 32; E. Muestra PVS positiva accesión 11; F. Muestra PVS negativa accesión 8; G. Muestra PLRV positiva accesión 35; H. Muestra PLRV negativa accesión 30. Las flechas negras señalan precipitación del sustrato morado indicando que se trata de muestras positivas



Un estudio realizado en Colombia entre 1984 y 1986 por Sánchez de Luque y colaboradores (1991) en zonas agroecológicas localizadas a diferente altitud mostró que la prevalencia de PVX, PVY, PVS, PLRV evaluado por métodos serológicos varió entre virus, semestres de cultivo y zonas agroecológicas, y que la prevalencia acumulada de los cuatro virus fluctuó entre el 18 y 87%. Este estudio también demostró efectos significativos en el rendimiento del cultivo de papa, que variaban dentro de las zonas agroecológicas estudiadas y podían causar pérdidas hasta del 50% (Sánchez de Luque, 1991). Es bien conocido que la papa es afectada por un gran número de virus que se transmiten a través del tubérculo-semilla perpetuándose en las variedades hasta hacerlas improductivas (Salazar, 1982). Otros estudios se han realizado para detección de estos cuatro virus, utilizando IMI en muestras de campo (Guzmán *et al.*, 2002 y en accesiones de la Colección Colombiana de *Solanum phureja* (Arciniegas, 2003). Todos estas publicación es informan alta prevalencia de infección viral. Tendiendo en cuenta que no existen tratamientos químicos que permitan el control de las enfermedades virales, en la CCCP se corre el riesgo de que los virus detectados (y los no detectados que potencialmente se encuentran presentes) puedan eventualmente afectar el rendimiento y calidad de los tubérculos de algunas accesiones hasta hacerlas totalmente improductivas, con la consecuente pérdida de materiales genéticamente valiosos.

Los resultados presentados sugieren que es urgente el empleo de estrategias de cultivo de tejidos, quimioterapia, crioterapia o termoterapia para la erradicación de virus en

el material evaluado. Estas técnicas han sido empleadas con éxito en algunos casos para la eliminación de virus de diferentes especies vegetales como por ejemplo frambuesa (Theiler-Hedtkich & Baumann, 1989), ajo (Conci & Nome, 1991), cereza (Deogratias *al.*, 1989) y papa (Qiaochun *et al.*, 2008) entre otros, y permitirían rescatar los materiales con mayor riesgo de desaparecer.

En conclusión, a pesar de tratarse de una muestra pequeña, nos permite concluir que las condiciones fitosanitarias de la CCCP no son óptimas para la conservación de material vegetal vivo. Esto debería prender las alarmas de las instituciones cuya misión es la preservación de de la CCCP para que generen estrategias y recursos que permitan el rescate de los materiales en riesgo y el monitoreo permanente de la colección, con el fin de preservar este importante banco de germoplasma para las generaciones futuras.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de los doctores José Dilmer Moreno, Iván Valbuena, Ma del Socorro Cerón de la Colección Colombiana de Papa CORPOICA-Tibaitatá, por su apoyo para la recolección de las muestras. También agradecemos a Patricia Rodríguez y a Verónica Román por su colaboración. Este trabajo fue financiado por Colciencias proyecto 115-2007, por el Laboratorio de Virus Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia y por la Universidad Militar Nueva Granada (PIC CIAS 329).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arciniegas, N. 2003. Técnicas de diagnóstico y evaluación de resistencia al virus del amarillamiento de las nervaduras de la papa (PVV) en accesiones de la colección central colombiana de *Solanum phureja*. Trabajo de grado maestría en Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C.
2. Astley D. 1992. Preservation of genetic diversity and accession integrity. *Field Crops Research* 29:205-224.
3. Cerón MS, Valbuena I, Moreno JD. 2005. Informe técnico de bancos de germoplasma del C. I. Tibaitatá. Bogotá: Corpoica. 22p.
4. Cevipapa, 2004. <http://www.cevipapa.org.co/estadísticas/estadísticas.php>
5. Conci V and Nome SF. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Journal of Phytopathology* 132:186-192
6. Deogratias JM, Dosba F and Lutz, A. 1989. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ring-spot virus and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy and in vitro culture. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 337-342.
7. FAO, 2008. [www.potato2008.org](http://www.potato2008.org)
8. Franco-Lara L and Barker, H. 1999. Characterization of resistance to potato leafroll virus accumulation in *Solanum phureja*. *Euphytica* 108: 137-144.
9. Garnsey SM, Permar TA, Cambra M. and Henderson CT. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). *Proceedings of the 12th Conf. of IOCV* (India 1998): 39-50.
10. Guzmán M. 1998. Caracterización biológica, serológica y molecular del virus de la tristeza de los cítricos en aislados ornamentales de Córcega. Tesis de doctorado, Universidad de Bordeaux II. Francia.
11. Guzmán M, Caro M, y Garcia Y. 2002. Técnica de inmunopresión en membranas de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PVX, PVY, PVS y PLRV que infectan a la papa (*Solanum spp.*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 4: 45-51.
12. Hawkes JG. 1990. The potato: Evolution, biodiversity, and genetic resources. Washington, D.C. Belhaven Press. 1-10 p.
13. Jeffries C. 1998. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germoplasm No. 19 Potato. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute; Food and Agriculture Organization of the United Nations.
14. Kameswara Rao N. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
15. Ministerio de Agricultura. 2004. Guía Ambiental para el cultivo de la papa. Fedepapa – Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Ed Diagráficas, 54p.
16. Qiaochun W, Cuellar WJ, Rajamäki ML, Hirata Y and Valkonen JPT. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9: 237-250.
17. Rivera AL, Valbuena RI, Hidalgo R y Moreno JD. 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica* 57: 175-180.
18. Salazar LF. 1982. Manual enfermedades virosas de la papa. Ed. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 111 p.
19. Sánchez de Luque C, Corzo P y O Pérez. 1991. Incidencia de virus de papa y su efecto sobre el rendimiento en tres zonas agroecológicas de Colombia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 4:36-51.
20. Salazar LF. 1995. Los virus de la papa y su control. Ed. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 226 p.
21. Theiler-Hedtkich, R and Baumann G. 1989. Elimination of Apple Mosaic Virus and Raspberry Bushy Dwarf Virus from Infected Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) by Tissue Culture. *Journal of Phytopathology* 127:193-199.