PN-ABD-717

RESEARCH GUIDE
GUIA DE INVESTIGACION
GUIDE DE RECHERCHE

CIP

Guía de Investigación CIP 3

CULTIVO DE TEJIDOS PARA LA ELIMINACION DE PATOGENOS

1987

R. Lizárraga, P. Tovar, U. Jayasinghe, J. Dodds

INTERNATIONAL POTATO CENTER (CIP)
CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
CENTRE INTERNATIONAL DE LA POMME DE TERRE (CIP)

Guía de Investigación CIP 3

CULTIVO DE TEJIDOS PARA LA ELIMINACION DE PATOGENOS

1987

Rolando Lizarraga, Pilar Tovar, Upali Jayasinghe, John Dodds

CIP
Apartado 5969
Lima, Perú

Ubicación:
Av. La Universidad s/n
La Molina - Lima

Tel. 366920
Télex 25672 PE
Cable CIPAPA, Lima

Guías de Investigación CIP (CRGs)

Las Guís de Investigación CIP (CRGs) describen tecnologías que han sido desarrolladas y utilizadas por el CIP y los Programas Nacionales de Papa. Las CRGs fueron producidos para promover el intercambio de información entre científicos y son actualizados regularmente para asegurar que describan los avances más recientes.

Lizarraga, R.; Tovar P.; Jayasinghe U.; Dodds J. 1987. Cultivo de Tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de Investigación CIP 3. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 23 pp.

Guía de Invstigación CIP 3

CULTIVO DE TEJIDOS PARA LA ELIMINACION DE PATOGENOS

1 Naturaleza de los patógenos
2 Termoterapia
3 Quimioterapia
4 Esterilización de la superficie
5 Antibióticos
6 Aislamiento y cultivo de meristemas
7 Mantenimiento de cultivos
8 Apéndice (preparación de medios)
9 Referencias

Los patógenos vegetales, tales como nematodos, hongos, bacterias y virus, pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas. Sin embargo, no todas las células resultan infectadas; los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de enfermedades por lo que es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo in vitro de meristemas, y lograr su crecimiento como plantas sanas.

Este documento describe los métodos que pueden aplicarse para eliminar los patógenos del material infectado y producir plantas "libres de patógenos", para la distribución internacional y propagación en un programa de semilla de papa.

1 NATURALEZA DE LOS PATOGENOS

Los patógenos vegetales incluyen nematodos, hongos, bacterias, rickettsias, micoplasmas, virus y viroides. Ellos pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas. Hasta el presente no existe información sobre rickettsias patógenas de papa.

El tamaño relativo de estos patógenos varía mucho. Entre los patógenos vegetales los nematodos son los más grandes y pueden ser observados fácilmente con un microscopio estereoscópico. Los virus y viroides son los más pequeños y se requiere de un microscopio electrónico para su observación.

La ocurrencia de una enfermedad no sólo depende de la presencia del hospedante y del patógeno. Las condiciones ambientales, especialmente la humedad y la temperatura, juegan un papel importante en el desarrollo de una enfermedad. Así, una enfermedad puede definirse como un producto de la interacción del hospedante, el patógeno, y el ambiente. Este concepto de una enfermedad es conocido como "el triángulo de la enfermedad".

La distribución de los diferentes patógenos dentro de la planta enferma varía también mucho. Pseudomonas solanacearum, el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) y los micoplasmas están restringidos al tejido vascular de una planta. Erwinia carotovora, y el virus X de la papa (PVX), invaden tanto el tejido vascular como el resto de los tejidos de la planta.

No todas las células en una planta enferma se encuentran infectadas con patógenos. Los tejidos meristemáticos de la raíz y brotes terminales de una planta infectada están, algunas veces, libres de virus. En algunas ocasiones, tal como sucede en la papa con el PVX y el TRV (tobacco rattle virus), solamente la cúpula y los primeros primordios foliares se encuentran libres de virus. Se desconoce la razón exacta por la que esto sucede; sin embargo, se cree que uno, o todos, de los siguientes factores son responsables de ello.

- Alta actividad metabólica: los virus se multiplican acompañando el curso del metabolismo del hospedante. Debido a la gran actividad metabólica en las células meristemáticas del hospedante, los virus no pueden tomar el control de la maquinaria biosintética del mismo.

- Carencia de tejido vascular: los virus se diseminan rápidamente a través del sistema vascular. Los virus que se ubican tan sólo en el floema (PLRV) no pueden invadir los tejidos meristemáticos debido a la ausencia de diferenciación celular. En esta zona meristemática, los virus que infectan los tejidos no vasculares se diseminan de célula a célula a través de los conductos intercelulares (plasmodesmos). Este es un proceso lento por lo que resulta relativamente difícil que los virus infecten en su totalidad a las células que vienen dividiéndose rápidamente.

- Alta concentración de auxinas: los tejidos meristemáticos de las plantas tienen una concentración más alta de auxinas que los tejidos de otras partes de las mismas. Algunos autores indican que estas auxinas inhiben la multiplicación de los virus.

Debido a que los tejidos meristemáticos se encuentran, algunas veces, libres de patógenos, es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo in vitro de meristemas, y mantenerlos hasta obtener plantas adultas sanas.

2 TERMOTERAPIA

La termoterapia a temperaturas elevadas (37°C) no elimina al viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV). El PSTV está compuesto por un único filamento de RNA, en forma de anillo, enroscado a manera de una gran espiral. Por esta razón es resistente a las nucleasas. Las altas temperaturas, lejos de reducir la concentración del viroide, favorecen su multiplicación (Sanger y Ramm, 1975). Por lo tanto, una prueba para PSTV debe llevarse a cabo al finalizar el período de termoterapia.

Un método que permite la erradicación del PSTV (Lizárraga et al., 1980) se basa en la observación de que en plantas en crecimiento a bajas temperaturas, la concentración del viroide es baja. En un experimento, las plantas fueron mantenidas a 8°C por cuatro meses. Luego se disectaron los meristemas apicales. El 30% de las plántulas regeneradas estaban libres de PSTV, aún en la segunda generación de tubérculos. Se observó una típica relación inversa entre el tamaño de la disección meristemática y el éxito en la erradicación (Lizárraga et al., 1982).

Este método, sin embargo, no es apropiado como una técnica de rutina debido a que toma mucho tiempo y es muy costosa. Puede ser muy útil en casos específicos en los cuales un clon muy valioso se encuentre muy infectado y no se cuenta con material que haya pasado la prueba contra este patógeno.

Experimentos llevados a cabo con diferentes sistemas de virus y sus hospedantes han demostrado que el tratamiento de plantas con temperaturas elevadas (termoterapia) lleva a una reducción en la concentración del virus en la planta (Kassanis, 1957; Quak, 1977). Se han dado diferentes razones para explicar este fenómeno; probablemente no sólo una, sino una combinación de ellas pueden ser la causa de la reducción en la concentración del

virus. Estas pueden incluir competencia por lugares de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, entre las células del hospedante que se encuentran en proceso de rápida división y las partículas del virus, lo cual puede llevar a un cambio en el balance entre la síntesis y degradación de las partículas del virus. También el ácido nucleico del virus, el portador de su información genética, está normalmente protegido del ataque de enzimas degradantes por una cubierta compuesta de muchas subunidades de proteína. A altas temperaturas, la unión entre estas subunidades se vuelve más débil, se pueden abrir aberturas temporales, y permitir el ataque de las nucleasas, lo que inactiva al virus y disminuye la concentración del mismo.

La termoterapia ha sido aplicada a tubérculos de papa en reposo. Se ha observado una reducción en la concentración de virus, especialmente del virus del enrollamiento de la hoja (PLRV). Sin embargo, la eliminación del virus no ha sido lograda, con la excepción del PLRV.

La termoterapia aplicada a la planta entera, al igual que la aplicada a tubérculos ya brotados, seguida por cultivo de meristemas, ha sido exitosamente utilizada para la eliminación de muchos virus de la papa (Stace-Smith y Mellor, 1970; Pennazio y Redulfi, 1973).

En el procedimiento estándar, los mejores resultados han sido obtenidos cuando la planta es decapitada antes de ser tratada por termoterapia, y las yemas axilares se encuentran creciendo mientras reciben el tratamiento de calor. Un régimen de temperatura diaria de 36°C por 16 horas, y 30°C por 8 horas, bajo luz continua de alta intensidad 10 000 lux = 108 μ $Es^{-1}m^{-2}$ (180 μ Einsteins/seg^{-1} x m^{-2}) mejoró las tasas de eliminación. Las plantas son mantenidas bajo estas condiciones por cuatro semanas. Meristemas, tanto de las yemas axilares, como de las yemas apicales, son aisladas y cultivadas como se muestra en la Sección 6.

3 QUIMIOTERAPIA

Como una alternativa a la termoterapia, se ha probado en papa la quimioterapia. Un análogo de nucleosido, el Virazole, conocido por su amplio espectro contra el DNA y el RNA de los virus que afectan a los animales, ha mostrado resultados variables cuando se ha aplicado, en aspersión, a las plantas de papa, o en cultivo hidropónico, seguido por cultivo de meristemas. Resultados preliminares muestran cierta promesa cuando los ápices meristemáticos disectados son cultivados en un medio con 100 ppm de Virazole.

Sin embargo, algunos informes indican que los productos químicos antivirales pueden causar mutaciones en las plantas. Por lo tanto, al presente, la termoterapia definitivamente es el método preferido de pretratamiento antes de efectuar el cultivo de meristemas.

4 ESTERILIZACION DE LA SUPERFICIE

Si la superficie del material vegetal está contaminada por patógenos o saprófitos, y éste es sembrado en un medio de cultivo, algunos de los contaminantes crecen rápidamente y pueden matar al tejido y órgano (explante) de la planta. La mayoría de los contaminantes de superficie, tales como bacterias y hongos, pueden ser eliminados por esterilización de la superficie del material vegetal con un agente esterilizador apropiado.

Los agentes esterilizadores de la superficie se aplican normalmente por 10-15 minutos. Bajo condiciones asépticas, la solución esterilizadora es luego eliminada y el material vegetal lavado 3 ó 4 veces durante 5 minutos cada vez por agitación en agua destilada estéril. El lavado es muy importante para eliminar el exceso del agente esterilizador el cual puede inhibir el crecimiento de la planta.

Etanol (Alcohol). El alcohol es un agente esterilizador común de la superficie para eliminar bacterias y hongos, y es frecuentemente utilizado como un breve lavado antes de aplicar otros tratamientos de esterilización de la superficie de las plantas. Tiene una baja tensión superficial y puede penetrar fácilmente entre las pilosidades foliares y mojar la superficie de la planta.

Hipoclorito de sodio o de calcio. La superficie del material vegetal puede también ser esterilizada con soluciones acuosas de hipoclorito de sodio (NaOCl) o de hipoclorito de calcio (Ca (OCl)). La sal de calcio es preferida porque es menos fitotóxica. Muchos laboratorios utilizan lejía de uso doméstico tal como el Clorox. Estos productos comerciales contienen normalmente 5,25% NaOCl como producto activo. Cuando se les diluye con agua (1 parte de lejía : 9 partes de agua), la solución esterilizadora resultante deberá contener no menos de 0,5% NaOCl.

Debido a la disociación completa, el hipoclorito tiene una actividad relativamente pequeña a un pH superior a 8,0, y es más efectivo fijando la solución a alrededor de pH 6,0.

La superficie del tejido recientemente disectado y sumergido completamente en la solución de hipoclorito, queda esterilizada después de una exposición de 10-15 minutos. A continuación del tratamiento con hipoclorito, el material tratado debe ser lavado cuidadosamente con varios cambios de agua destilada, para eliminar completamente el desinfectante.

Bicloruro de mercurio. El bicloruro de mercurio ($Hgcl_2$) ha sido utilizado como desinfectante pese a que es estremadamente tóxico. La solución de bicloruro de mercurio es volátil a temperatura ambiente y puede provocar un envenenamiento por mercurio. Por lo tanto:

¡No recomendamos su uso como agente esterilizador!

Bactericidas y fungicidas. Con el material que se encuentra fuertemente contaminado, algunos investigadores recomiendan el lavado en una mezcla bactericida/fungicida comercial antes de proceder a la esterilización de su superficie. Debe recordarse, sin embargo, que este tratamiento no tiene efecto sobre infecciones sistémicas. La Sección 3 da una lista de bactericidas y fungicidas conjuntamente con información referente a su uso.

5 ANTIBIOTICOS

A pesar de ser usados rutinariamente en el cultivo de células animales para prevenir contaminaciones bacterianas, los antibióticos no han sido muy utilizados en cultivo de tejidos vegetales. Los fisiólogos, a finales de los años 50 sabían que estos productos naturales pueden alterar el crecimiento y desarrollo de los cultivo in vitro de tejidos vegetales (Gautheret, 1959; Butenko, 1964). De hecho, los tejidos vegetales son sensibles a los antibióticos y muestran una respuesta variable de acuerdo a su genotipo.

La mayoría de los especialistas en cultivo de tejidos no confían en los antibióticos para eliminar los contaminantes superficiales de las disecciones. Estos productos son caros y ninguno es efectivo contra todos los tipos posibles de organismos contaminantes. Los antibióticos son sólo utilizados cuando los microorganismos son difíciles de eliminar por otros medios.

Los siguientes antibióticos o combinaciones de los mismos han sido exitosamente aplicados:

- Gentamicina
- Rifampicina
- Nistatina + Carbenecilina
- Gentamicina + Amfotericina B
- Vancomicina-HCl + Micostatin
- Estreptomicina + Carbenecilina

En algunos cultivos se ha encontrado fitotoxicidad causada por:

- Penicilina
- Estreptomicina
- Bactericina
- Esparsomicina

6 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MERISTEMAS

El punto activo de crecimiento del ápice de la planta es el meristema. Es una zona pequeña compuesta de células (meristemáticas) dividiéndose rápidamente.

El domo de la yema apical contiene las verdaderas células meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias. Debido a que los tejidos vasculares más diferenciados se encuentran alejados de los meristemas (hacia los tejidos más viejos del tallo), los elementos vasculares de los primordios foliares son incipientes, y no han hecho aún contacto con la parte principal del sistema vascular en el tallo. Por lo tanto, las partículas de virus que puedan estar presentes en el sistema vascular, pueden llegar a la zona meristemática del ápice solamente moviéndose de célula en célula; un proceso lento. Esta es una de las razones principales del por qué en una planta infectada con virus, la concentración de éstos disminuye acropetalmente hacia los meristemas tanto del ápice como de las yemas axilares.

El aislamiento, en condiciones asépticas de la porción apical, llamada el punto meristemático, y su cultivo en un medio nutritivo adecuado e igualmente aséptico, permite el desarrollo de plántulas. En principio, esta secuencia de desarrollo sigue un patrón similar al de aquel presente en una planta normal. Las células del meristema se dividen y la diferenciación de nuevos tejidos continúa. La nutrición de la sección disectada por la planta es proporcionada por el medio artificial. Esta técnica, llamada cultivo de meristemas, fue aplicada por primera vez para la erradicación de virus en dalias hace unos 30 años, por Morel y Martin (1952), y lleva a la obtención de plantas libres de patógenos.

La disección aséptica del meristema es un proceso delicado y requiere muchas horas de práctica. La secuencia de la disección se muestra fotográficamente (Figura 3) y es llevada a cabo como sigue.

Se cortan los tallos de la planta, que acaba de ser sometida a termoterapia, en segmentos conteniendo cada uno un nudo con su yema auxiliar. Se remueven las hojas cuidadosamente. Se desinfectan los segmentos de tallo durante 30 segundos en alcohol de 70%, y a continuación con hipoclorito de calcio al 2,5% durante 15 minutos. Luego los tallos son lavados cuatro veces, por cinco minutos cada vez, con agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito.

Bajo un microscopio binocular de disección, se eliminan las hojuelas que rodean el punto de crecimiento hasta que quede solamente la cúpula de la yema apical y unos cuantos primordios foliares. La cúpula y dos primordios foliares son disectados y transferidos al medio de cultivo meristemático (vea Apéndice). El meristema disectado es transferido semanalmente a medio fresco. Después de 6-8 semanas, las pequeñas plántulas son subcultivadas para un mayor crecimiento y micropropagación (Espinoza et al., 1984).

Después de la regeneración a partir de los meristemas, las plantas son probadas para detectar cualquier infección persistente de virus. Vea las siguientes referencias en la Sección 9:

Fribourg, C., Nakashima, J., 1981	-	Prueba del látex
Salazar, L.F., 1981	-	Detección de PSTV
Salazar, L.F., 1982	-	Detección de virus
Salazar, L.F., 1983	-	ELISA

7 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS

El material *in vitro* puede ser conservado en cultivos por un tiempo indefinido cuando se toman suficientes precauciones para evitar contaminaciones, y la transferencia a medio fresco es realizada a intervalos apropiados. Las plántulas *in vitro* probadas contra patógenos pueden ser mantenidas como colecciones base, para propagación en un programa de semilla.

Para mantenimiento por un período corto, las plantas son mantenidas en tubos, sobre medio de propagación B (vea Apéndice). Los tubos son sellados con tapas de plástico autoclavables. Estas son mejores que los tapones de algodón que pueden ser penetrados fácilmente por las esporas de hongos presentes en el aire y por insectos.

La tasa de crecimiento de las plantas depende de la temperatura de incubación, la composición del medio, y del genotipo.

Los medios C y D (vea Apéndice) para almacenamiento ejercen un estrés osmótico sobre las plántulas y pueden ser utilizados para almacenamiento a 25°C; el estrés reduce la tasa de crecimiento y da lugar a entrenudos cortos. Muchos nudos están así disponibles cuando se inicia la propagación del material almacenado. El material almacenado bajo estas condiciones necesita normalmente ser transferido solamente una vez al año.

Cuando se utiliza el medio C, la temperatura puede bajarse a 8°C. Esto reduce significativamente la tasa de crecimiento de las plántulas y las transferencias son requeridas solamente una vez cada 2 ó 3 años.

Es posible, por lo tanto, mantener una colección de germoplasma bajo las condiciones de almacenamiento descritas anteriormente. Cuando se recibe un pedido para la exportación de un determinado genotipo probado contra patógenos, éste puede sacarse del almacenamiento, ser micropropagado, y luego ser distribuido, in vitro.

8 APENDICE (preparación de medios)

Todos los medios utilizados para este trabajo están basados en las sales de Murashige y Skoog (1962). Las soluciones concentradas de sales son normalmente preparadas en cuatro partes separadas:

- Sales
- $MgSO_4$
- Fierro
- Vitaminas

Solución concentrada de sales: disuelva cada sal en 200 cm^3 de agua destilada:

- NH_4NO_3	35	g
- KNO_3	40	g
- $CaCl_2.2H_2O$	9	g
- KH_2PO_4	3,5	g
- H_3BO_3	0,1	g
- $MnSO_4.4H_2O$	0,5	g
- ($MnSO_4.H_2O$	0,4	g)
- $ZnSO_4.7H_2O$	0,2	g
- ($ZnSO_4.H_2O$	0,1	g)
- KI	0,02	g
- $Na_2MoO_4.2H_2O$	0,005	g

Disuelva 5 mg (0,005 g) de las siguientes sales, juntas, en 10 cm^3 de agua; agregue 1 cm^3 de esta solución a 200 cm^3 de agua para la solución concentrada.

- $CuSO_4.5H_2O$ y $CoCl_2.6H_2O$

Mezcle las diez soluciones de sales individuales, juntas, para hacer 2 000 cm^3 de la solución concentrada de sales.

Solución concentrada de $MgSO_4$

- $MgSO_4.7H_2O$ 3,7 g en 100 cm^3 de agua destilada

Solución concentrada de fierro

- Na_2EDTA 0,75 g
- $FeSO_4.7H_2O$ 0,55 g

Disuelva $FeSO_4.7H_2O$ en 20 cm^3 de agua destilada; Na_2EDTA en 20 cm^3 de agua destilada caliente. Mezcle las soluciones y lleve a 100 cm^3 con agua destilada.

Solución concentrada de vitaminas

- Tiamina HCl 40 mg en 100 cm^3 de agua destilada

Preparación del medio. Prepare 1 litro (dm^3) del medio básico de Murashige-Skoog mezclando las soluciones concentradas con Inositol en las siguientes proporciones:

Sales	100 cm^3
$MgSO_4$	10 cm^3
Fierro	5 cm^3
Vitaminas	1 cm^3
Inositol	100 mg

Agregue las hormonas que correspondan y sacarosa (vea la sección siguiente), y ponga el medio en la autoclave, con o sin agar, por 15 minutos.

Adiciones al medio MS básico para la preparación de tipos específicos de medios.

Medios	+	Adiciones	
A (meristemas)		0,25 ppm	Acido Giberélico
		2,00 ppm	Pantotenato de Calcio
		3,0 %	Sacarosa
		0,6 %	Agar
B (propagación)		0,25 ppm	Acido Giberélico
		2,00 ppm	Pantotenato de Calcio
		3,0 %	Sacarosa
		0,8 %	Agar
C (almacenamiento)		4,0 %	Mannitol
		3,0 %	Sacarosa
		0,8 %	Agar
D (almacenamiento)		4,0 %	Mannitol
		0,5 %	Sacarosa
		0,8 %	Agar

9 REFERENCIAS

Butenko, R.G. 1964. Plant tissue culture and plant morphogenesis. Translated from Rusian Jerusalem. Israel Program for Scientific Translations. 1968.

Espinoza, N.; Estrada, R.; Tovar, P.; Bryan, J.; Dodds, J.H. 1985. Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Documento de Tecnología Especializada 1. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 17 p.

Fribourg, C.; Nakashima, J. 1981. Prueba de látex para detectar virus de papa. Juego de Diapositivas y Guía. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 31 diapositivas, 12 p.

Gautheret, R.J. 1959. La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations. Mason, Paris.

Kassanis, B. 1957. The use of tissue culture to produce virus free clones from infected potato varieties. Annals of Applied Biology 45: 422-427.

Lizarraga, R.E.; Salazar, L.F.; Roca, W.H.; Schilde-Rentschler, L. 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. Phytopathology 70: 754-755.

Lizarraga, R.E.; Salazar, L.F. 1982. Effect of meristem size on eradication of potato spindle tuber viroid. pp. 118-119. In: Hooker, W.J. (ed.). Research for the potato in the year 2000. International Potato Center, Lima, Peru. 199 p.

Morel, G.M.; Martin, C. 1952. Guerison de dahlias atteints d'une maladie á virus. Comptes rendus hebdomaire des séances de l'Academie des Sciences, Paris 235: 1324-1325.

Murashige, T.; Skoog, F.C. 1962. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Pennazio, S.; Redolfi, P. 1973. Factors affecting the culture in vitro of potato meristem tips. Potato Research 16: 20-29.

Quak, F. 1977. Meristem culture and virus free plants. pp. 598-615. In: Reinert, J.; Bajaj, Y.P.S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin.

Salazar, L.F. 1981. Detection of PSTV by gel electrophoresis. Slide Set and Guide Book. International Potato Center, Lima, Peru. 38 slides, 10 p.

Salazar, L.F. 1982. Detección de virus en la producción de semilla de papa. Boletín de Información Técnica 18. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 14 p.

Salazar, L.F. 1983. Detección con ELISA de virus de papa. Juego de Diapositivas y Guía. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 31 diapositivas, 12 p.

Sanger, H. L.; Ramm, K. 1975. Radioactive labelling of viroid RNA. pp. 230-253. In: Markham et al. (eds.). Modification of the information content of plant cells. Proceedings of 2nd John Innes Symposium, Norwich U.K.

Stace-Smith, R.; Mellor, F.C. 1970. Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology. 60:1957-1958.

Impreso por el Departamento de Capacitación y Comunicaciones, CIP, Lima
Marzo 1988
300 Copias