

# HQU - Sweetpotato Indicator plant diagnostic procedure - OP022

**Date:** Nov 13, 2012 9:08 PM

**URL:**

<https://research.cip.cgiar.org/confluence/display/gadc/HQU+++Sweetpotato+Indicator+plant+diagnostic+pr>

# Table of Contents

---

1	INTRODUCTION	4
2	SCOPE	5
3	SAFETY	6
4	MATERIALS	7
5	PROCEDURE	8
5.1	Preparation of <i>I. setosa</i> indicator plants	8
5.1.1	1. Scarification	8
5.1.2	2. Germination	8
5.1.3	3. Production of plants	8
5.2	Wedge-grafting	8
5.3	INTERNAL QUALITY CONTROL	9
6	INTRODUCCIÓN	10
7	ALCANCE	11
8	SEGURIDAD	12
9	MATERIALES	13
10	PROCEDIMIENTO	14
10.1	Preparación de plantas indicadora <i>I. setosa</i>	14
10.1.1	1. Escarificación	14
10.1.2	2. Germinación	14
10.1.3	3. Producción de plantas	14
10.2	Injerto de cuña	14
10.3	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	15

<b>TITLE</b>	<b>HQU - Sweetpotato Indicator plant diagnostic procedure - OP022</b>
OWNER	<a href="#">Head Virology – Sweetpotato Unit</a>
APPROVER	<a href="#">Head HQU</a>
APPROVAL DATE	May 10, 2012
ISSUE DATE	Sep 10, 2012 16:14
CONTRIBUTORS	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>
CITATION	022
KEYWORDS	<a href="#">accredited</a> , <a href="#">procedure</a> , <a href="#">head_virology</a> , <a href="#">s_fuentes</a>
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP022
VERSION NUMBER	<a href="#">56</a>
SPANISH VERSION	

**INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP**



**GADC Logo**

Version	Date	Author	Comment
<a href="#">56</a>	Sep 10, 2012 16:14	<a href="#">Hirahoka, Daniel (CIP)</a>	
<a href="#">55</a>	Sep 10, 2012 15:56	<a href="#">Hirahoka, Daniel (CIP)</a>	
<a href="#">54</a>	May 17, 2012 20:28	<a href="#">Simon, Reinhard (CIP)</a>	
<a href="#">53</a>	May 17, 2012 20:21	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>	
<a href="#">52</a>	May 17, 2012 20:19	<a href="#">Fuentes, Segundo (CIP)</a>	

# 1 INTRODUCTION

Grafting is a technique whereby cut tissue surfaces of different plants are placed in close contact to effect a union. Grafting is considered to be a universal method for transmitting viruses, because grafting can transmit systemic viruses. Some grafts, however, are easier to do than others. Grafting is particularly useful for transmission of phloem-restricted viruses that cannot be transmitted mechanically and viruses whose vectors remain unknown, and for detecting viruses found in low concentrations.

Virus transmission by grafting may not be 100%-effective if the virus is unable to cross the graft union, or if the virus source plant was not totally invaded and the portion used was virus-free due to irregular virus distribution.

Successful virus transmission depends on the characteristics of the virus and on the union achieved through grafting. A virus such as Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), which is restricted to the vascular system, can be transmitted only when vascular tissues are united. On the other hand, viruses affecting the parenchyma (e.g. Sweetpotato feathery mottle virus, SPFMV) can be transmitted more easily because the transmission depends solely on the union of the cortex or the medulla.

There are several types of grafts, but wedge-graft is the most common used on sweetpotato virus diagnosis (see Figure 1).

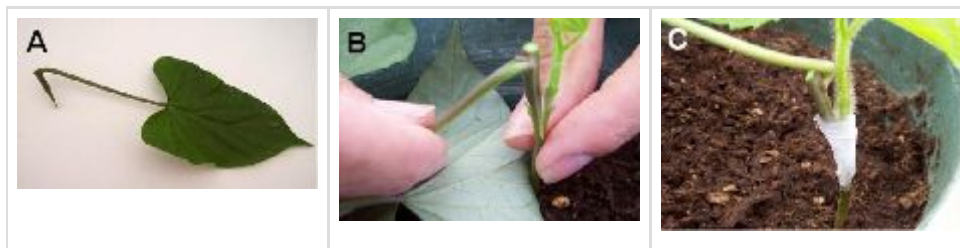


Figure 1. Grafting to *Ipomoea setosa* indicator plant for sweetpotato virus indexing. Sweetpotato node with attached leaf (A) being wedge-grafted on the stem of an *I. setosa* indicator plant (B). Completed grafting of a sweetpotato node on to an indicator plant (C).

## 2 SCOPE

---

Grafting allows transmission of all viruses. Sweetpotato viruses infect *Ipomoea setosa* causing visible symptoms.

## 3 SAFETY

---

A laboratory coat should be worn at all times when working in the greenhouse.

New razor blades should be used when grafting per accession.

Be careful when manipulating sulfuric acid 98% since it causes severe irritation and burns. May be harmful if swallowed. Avoid breathing vapor. Use with adequate ventilation. Avoid contact with eyes, skin, and clothes. Wash thoroughly after handling. Keep container closed. In case of spill, dilute with water and mop up, or absorb with an inert dry material and place in an appropriate waste disposal container. If necessary: Neutralize the residue with a dilute solution of sodium carbonate.

## 4 MATERIALS

---

Parafilm strips

Sticks for supporting the plants

Plastic (polystyrene) bags 14"x14"x2 (wide, long and thickness, respectively. Thickness in thousandth of a inch)

*Ipomoea setosa* indicator plants (recipient host, 'stock')

Sweetpotato plant materials (donor host, 'scions')

## 5 PROCEDURE

---

### 5.1 Preparation of *I. setosa* indicator plants

---

#### 5.1.1 1. Scarification

Place *I. setosa* seeds in the bottom of a beaker.

Add concentrated sulphuric acid (98%) up to 0.5 cm in height above seed level.

Keep the seeds immersed in the acid for 50 min (or 20 min for *I. nil* seeds), making sure they are completely covered with acid.

Pour off acid (preferably into adequate container for disposal).

Dip seeds in a container full of water and stir liquid for a few minutes with a rod (you may use a wide bottomed bucket or a plastic tray).

Rinse seeds 3-4 times and help with fingers to eliminate peel remaining attached to the seeds.

#### 5.1.2 2. Germination

Treated seeds are placed in plastic Petri dishes of 10 cm in diam. or trays containing five layers of water-soaked paper (avoid excess water).

Cover seeds with an additional layer of paper and wet it.

Maintain seeds at  $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$  until germination. Add water if necessary. Do not use more than 30 seeds per plate or 150 seeds per tray.

#### 5.1.3 3. Production of plants

Three or four days after emergence of hypocotyl and radicle, eliminate the seed cover attached to the seedlings.

In a screenhouse at  $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$ , transplant the seedlings to jiffy strips for 3-4 days and then to individual pots for approx. 2 weeks until plants have 2-3 fully expanded true leaves.

### 5.2 Wedge-grafting

---

Remove most of the older leaves from the 3-4 week old indicator plant (stock), which should have 2-3 fully expanded true leaves .

Cut an oblique, 0.5-1 cm deep, incision downwards into the stem.

From the donor host (scion) remove a node with a fully expanded leaf attached from the basal part of the plant.



Trim the scions of the node to a 0.5-1cm long wedge.

Insert the scion into the incision and fix (wrap) the graft with parafilm.

Cover the grafted plant with a moist plastic bag for 3 days.

Maintain the plants in a screenhouse at  $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$  with good illumination (85 - 278  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$  (10,000 - 15,000 lux) light intensity) for 4 weeks.

Record symptoms caused by virus infection in the grafted *I. setosa*.

## 5.3 INTERNAL QUALITY CONTROL

---

Some stems from one indicator plant are grafted on to another indicator plant as grafting success control.

Batches of indicator plant (*I. setosa*) are grown from seeds every time indexing is performed. Symptoms are recorded on the sample worksheet after observing the plant on three occasions.

## 6 INTRODUCCIÓN

El injerto es una técnica por el cual la superficie de tejidos cortados de diferentes plantas con puestos en contacto para efectuar una unión. El injerto es considerado como el método universal para transmitir virus, ya que se pueden transmitir los virus sistémicos. Algunos injertos, sin embargo, son mas fáciles de realizar que otros. El injerto es particularmente útil para la transmisión de virus restringidos al floema que no pueden ser transmitidos mecánicamente y para aquellos virus cuyos vectores son desconocidos, y para detectar virus que se encuentran en baja concentración en los tejidos de la planta.

La transmisión de los virus mediante injerto puede no ser 100% efectivo si el virus es incapaz de cruzar la unión del injerto, o si la planta fuente de virus no fue totalmente invadida y la porción usada para el injerto estuvo libre de virus debido a la distribución irregular del virus en los tejidos de la planta.

El éxito en la transmisión del virus depende en las características del virus y de la unión lograda a través del injerto. Un virus tal como el Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), el cual es restringido al sistema vascular, puede ser transmitido solo cuando los tejidos vasculares están unidos. Por otra parte, los virus que afectan el parénquima (ejemplo Sweetpotato feathery mottle virus, SPFMV) pueden ser transmitidos con mayor facilidad porque la transmisión depende solamente de la unión de la corteza o de la médula. Existen varios tipos de injertos, pero el injerto de cuña es el mas comunmente usado en el diagnóstico de virus en camote (ver Figura 1).



Figura 1. Injerto a la planta indicadora *Ipomoea setosa* para el indexado de virus en camote. Nudo con una hoja de camote (A) siendo lateralmente injertado (injerto de cuña) en el tallo de una planta indicadora *I. setosa* (B). Injerto completo de un nudo de camote sobre una planta indicadora (C).

## 7 ALCANCE

---

El injerto permite la transmisión de todos los virus. Los virus de camote infectan a *Ipomoea setosa* causando síntomas visibles.

## 8 SEGURIDAD

---

Usar guardapolvo todo el tiempo cuando se trabaje en el invernadero.

Usar hojas de afeitar nuevas por cada accesión cuando se realicen los injertos.

Tenga cuidado cuando manipula el ácido sulfúrico 98%, ello causa irritación y quemaduras graves. Puede ser dañino si se ingiere. Evite respirar el vapor. Use con ventilación adecuada. Evite el contacto con ojos, piel y ropa. Lavar a fondo después de manipularlo. Mantenga el recipiente cerrado. En caso de derrame, diluir con el agua y limpiar, o absorber con un material inerte seco y colocar en un contenedor adecuado de residuos. Si es necesario, neutralizar el residuo con una solución diluida de carbonato de sodio.

## 9 MATERIALES

---

Tiras de Parafilm

Estacas para apoyo/sostén de las plantas

Bolsa plásticas de poliestireno 14"x14"x2 (ancho, largo y grosor, respectivamente. Grosor en milésima de pulgada)

Plantas indicadora de *Ipomoea setosa* (hospedero receptor, 'stock')

Plantas de camote (hospedero donador, 'scions')

## 10 PROCEDIMIENTO

---

### 10.1 Preparación de plantas indicadora *I. setosa*

---

#### 10.1.1 1. Escarificación

Poner semillas de *I. setosa* en el fondo de un vaso.

Añadir ácido sulfúrico concentrado (98%) hasta 0.5 cm de altura por encima del nivel de las semillas.

Mantener las semillas inmersas en el ácido por 50 min (o por 20 min para las semillas de *I. nil*), asegurarse que ellas estén completamente cubiertas con el ácido.

Vaciar/verter el ácido (preferiblemente dentro de un depósito adecuado para descarte).

Sumergir las semillas en un depósito lleno con agua y agitar el líquido por algunos minutos con una varilla (puede usar un balde con el fondo amplio o una bandeja plástica).

Lavar las semillas 3-4 veces y ayudarse con los dedos para eliminar la cubierta remanente que permanece adherida a las semillas.

#### 10.1.2 2. Germinación

Las semillas escarificadas son colocadas en placas Petri de 10 cm de diámetro ó bandejas conteniendo 5 capas de papel toalla humedecido con agua (eliminar el exceso de agua).

Cubrir las semillas con una capa adicional de papel, el cual es humedecido.

Mantener las semillas a  $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$  hasta que germinen. Añadir agua si llega a ser necesario. No use mas de 30 semillas por placa ó 150 semillas por bandeja.

#### 10.1.3 3. Producción de plantas

Tres o cuatro días después de la emergencia de hipocotilo y las radículas, eliminar la cubierta de la semilla adherida a las plántulas.

En un invernadero a  $24\text{-}26^{\circ}\text{C}$ , transplantar las plántulas a periquetes (jiffy strips) por 3-4 días y luego a macetas individuales por aproximadamente 2 semanas hasta que las plantas tengan 2-3 hojas verdaderas completamente extendidas.

### 10.2 Injerto de cuña

---

Remover la mayoría de las hojas viejas de la planta indicadora de 3-4 semanas de edad ('stock'), el cual tiene 2-3 hojas verdaderas completamente extendidas.

Hacer un corte oblicuo, 0.5-1 cm de profundidad, hacia abajo en el tallo de la planta.

Del hospedero donador ('scion') remover un nudo con una hoja completamente extendida de la parte basal de la planta.

Recortar la púa del nudo a una cuña de 0.5-1cm de longitud.

Insertar la púa (nudo con hoja) en el corte oblicuo y fijar (envolver) el injerto con parafilm.

Cubrir las plantas injertadas con un bolsa plástica humedecida por 3 días.

Mantener las plantas en el invernadero a  $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$  con buena iluminación (185 - 278  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$  (10,000 - 15,000 lux) intensidad de luz) por 4 semanas.

Registrar los síntomas causados por la infección viral en la planta de *I. setosa* injertada.

## 10.3 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

---

Tallos de una planta indicadora son injertados a otra planta indicadora como un control del éxito del injerto.

Grupo de plántas indicadoras (*I. setosa*) son crecidas de semillas cada vez que se realiza el indexado. Los síntomas se registran en la hoja de trabajo de muestreo después de observar en tres ocasiones.