


Health status testing and virus elimination in sweetpotato - OP18

TITLE	Health status testing and virus elimination in sweetpotato - OP18
OWNER	Head_IVU, B.Zea, S.Fuentes
APPROVER	Head Genebank
APPROVAL DATE	
ISSUE DATE	Sep 13, 2010 20:00
CONTRIBUTORS	
CITATION	
KEYWORDS	procedure , accredited , head_ivu , head_genebank , b_zea , s_fuentes
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP18
VERSION NUMBER	40
SPANISH VERSION	

INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP			
			
Version	Date	Author	Comment
40	Sep 13, 2010 20:00	Brenda Zea	
39	Sep 13, 2010 14:35	Brenda Zea	
38	Sep 13, 2010 14:23	Brenda Zea	
37	Sep 10, 2010 10:57	Brenda Zea	
36	Sep 08, 2010 16:37	Brenda Zea	

INTRODUCTION

Virus elimination will be carried out in all materials maintained or generated at CIP, and prior to its distribution. The virus elimination technique is based on thermotherapy and meristem culture. Clones, which have tested negative to all known pathogens, using enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA) and the indicator plant *Ipomoea setosa* test, can be distributed internationally.

SCOPE

This procedure covers the health testing and virus elimination of sweetpotato germplasm maintained in the genebank or generated at CIP prior to its distribution.

SAFETY

The personal should know the following protocols:

Preparation of Cultivation Media - OP74

Good practices during *in vitro* bank activities

MATERIALS

Equipment	
Autoclave	Medium dispenser
PHmeter	Analytical balance
Laminar flow chamber	Shakers
Refrigerator	Cultivation growth chamber
Oven	Microwave oven
Other materials	
Glass test tube	Cotton
Petri dishes	Alcohol
Forceps	Burner
Blades	Sterilizer
Saran wrap or Parafilm	



PROCEDURE

Material
1. Starting material can come from <i>in vitro</i> plantlets from the CIP genebank, <i>in vitro</i> plantlets from outside CIP or from roots or cuttings.
2. <i>In vitro</i> plantlets from outside CIP must pass an incubation period of 'quarantine' before the initial health status testing.
3. Roots or cuttings are planted in pots under quarantine conditions.
Introduction to <i>in vitro</i> culture and multiplication
4. Introduce <i>greenhouse</i> material into <i>in vitro</i> according to the protocol for introduction to <i>in vitro</i> culture.
5. Culture one explant containing two buds for 5 weeks in an 18x150 mm test tube with MPB media (Table 1). This plantlet is considered the mother plant.
6. Multiply the mother plantlet into three test tubes. Place one explant containing two buds in an 18x150 mm test tube with MMB media. Two test tubes will be conserved as the stock HS0, and one test tube will be used for health testing.
Initial health status testing
7. Health status testing includes: NCM-ELISA, symptomatology observation and grafting stem cuttings into the indicator plant <i>Ipomoea setosa</i> . NASH test and PCR are optional to confirm the presence of some viruses for which antisera are not available.
8. One month-old <i>in vitro</i> plantlet is grown in jiffy for 30 days and then transferred to a pot for 30-45 days under greenhouse conditions.
9. Make grafts of two nodes from the basal part of each sweetpotato plant to two separated <i>I. setosa</i> plants three-weeks-old (both growing together in a pot).

10. Hold grafted- <i>I. setosa</i> plants for a minimum of 30 days for observation and recording of symptoms expression if any.
11. Assay the <i>I. setosa</i> plants by NCM-ELISA test with available antisera (SPFMV, SPLV, SPMMV, SPVG, SPMSV, SPCFV, C-6 virus, SPCSV, SPCaLV, and CMV). See below for definition of virus
12. Prune negative sweetpotato plants and allow them to grow to at least 10-15 nodes before doing a second round of grafting, NCM-ELISA test, and recording symptoms to confirm results.
13. After the initial virus testing, virus positive accessions are submitted to the virus elimination process.
14. Pathogen-free clones are multiplied and included in the <i>in vitro</i> genebank as HS2.
Virus elimination: thermotherapy, meristem isolation and culture
15. Multiply the stock HS0 plantlet into four 25x150 mm test tubes with MPB medium, placing two explants in each tube.
16. 10 -15 days old <i>in vitro</i> plantlets are submitted to thermotherapy at 35-37°C during 1 month.
17. Eight meristems, 0.2-0.35 mm long, are excised and cultivated in 13x100 mm test tubes containing meristem medium 1 (MM1) (Table 1).
18. Meristems are sub-cultivated with MM1 medium at 3 and 6 days after meristem excision, then they are sub-cultivated every 15 days with MM3 medium (Table 1), until a rooted plantlet with at least three nodes is obtained
Health testing
19. After plantlets are obtained from meristem culture, they are propagated and tested as described above to detect any remaining virus infection.
20. Accessions that result pathogen-free are multiplied and included in the <i>in vitro</i> genebank as HS2. Identity verification must be conducted on these materials before their distribution.
21. Accessions that result virus positive must enter the cleaning process again (thermotherapy and meristem culture).

Table 1. Multiplication and meristem media composition for *in vitro* culture of sweetpotato

	MPB	MM1	MM3
MS salts (g/L)	4.3	4.3	4.3
Ascorbic acid (g/L)	0.2	0.1	0.1
Calcium nitrate (g/L)	0.1	0.1	0.1
Calcium panthotenate (mg/L)	2	2	2
Gibberellic acid (mg/L)	10	20	10
L-Arginine (g/L)	0.1	0.1	0.1
Putrescine-HCl (mg/L)	20	20	20
Sucrose (g/L)	30	30	30
Coconut milk (mL/L)	—	10	10
Agar (g/L)	—	6	6
Phytigel (g/L)	3	—	—
pH	5.7	5.7	5.7

Virus names

SPFMV: *Sweetpotato feathery mottle virus*; SPLV: *Sweetpotato latent virus*; SPMMV: *Sweetpotato mild mottle virus*; SPVG: *Sweetpotato virus G*; SPMSV: *Sweetpotato mild speckling virus*; SPCFV: *Sweetpotato chlorotic fleck virus*; C-6 virus; SPCSV: *Sweetpotato chlorotic stunt virus*; SPCaLV: *Sweetpotato caulimo-like virus*; and CMV: *Cucumber mosaic virus*.

INTRODUCCION

La eliminación de virus será realizada en todos los materiales mantenidos o generados en el CIP, previamente a su distribución. La técnica de eliminación de virus está basada en la termoterapia y el cultivo de meristemos. Los clones, que han resultado negativos a todos los patógenos conocidos, usando la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzima en membranas de nitrocelulosa (NCM-ELISA) y la planta *Ipomoea setosa* como indicadora; pueden ser distribuidos internacionalmente.

ALCANCES

Este procedimiento cubre las pruebas sanitarias y de eliminación de virus del germoplasma de camote mantenido en el banco de germoplasma o generado en el CIP, previo a su distribución.

SEGURIDAD

El personal deberá conocer los siguientes protocolos:

[Preparación de medios de cultivo](#)

[Buenas prácticas durante las actividades in vitro del banco](#)

MATERIALES

Equipos	
Autoclave	Dispensador de medio
PHmetro	Balanza analítica
Camara de flujo laminar	Agitadores
Refrigerador	Cámara de crecimiento de cultivo
Horno	Horno microondas
Otros materiales	
Tubos de prueba de vidrio	Algodón
Placas petri	Alcohol
Pinzas	Mechero
Hojas de bisturí #10	Esterilizador
Saran wrap or Parafilm	



PROCEDIMIENTO

Material

1. El material inicial puede provenir de plántulas *in vitro* del banco de germoplasma del CIP, de plántulas *in vitro* externas al CIP o de raíces o esquejes.
2. *Plántulas in vitro* externas al CIP deben pasar por un período de incubación de "cuarentena" previo a la prueba del estado sanitario inicial.
3. Raíces o esquejes son plantados en macetas bajo condiciones de cuarentena.

Introducción al cultivo *in vitro* y multiplicación

4. Introducir el material de invernadero a *in vitro* de acuerdo al protocolo para introducción al cultivo *in vitro*.

5. Cultivar un explante conteniendo dos yemas por 5 semanas en un tubo de ensayo de 18x150mm con medio MPB (Tabla 1). Esta plántula es considerada la planta madre.
6. Multiplicar la plántula madre dentro de tres tubos de ensayo. Colocar un explante conteniendo dos yemas en un tubo de ensayo de 18x150mm conteniendo medio MMB. Dos tubos serán conservados como el stock HS0, y uno será usado para la prueba sanitaria.
Prueba del estado sanitario inicial
7. La prueba del estado sanitario incluye: NCM-ELISA, observación sintomatológica y esqueje de tallos injertados en la planta indicadora <i>Ipomoea setosa</i> . La prueba de NASH y PCR son opcionales para confirmar la presencia de algún virus para el cual el anti-suero no está disponible.
8. Una plántula <i>in vitro</i> de 1 mes es cultivada en jiffy por 30 días y luego es transferida a macetas por un período de 30 a 45 días bajo condiciones de invernadero.
9. Realizar injertos de dos nudos desde la parte basal de cada planta de camote en dos plantas separadas de <i>Ipomoea setosa</i> de tres semanas de edad (ambas cultivadas en una maceta).
10. Mantener en observación las plantas injertadas de <i>Ipomoea setosa</i> por un mínimo de 30 días y registrar la expresión de los síntomas si los hubiera.
11. Realizar un NCM-ELISA en las plantas de <i>I. setosa</i> con sueros disponibles (SPFMV, SPLV, SPMNV, SPVG, SPMSV, SPCFV, virus C-6, SPCSV, SPCaLV , y CMV). Ver abajo la definición de los virus.
12. Podar las plantas de camote negativas y permitir su crecimiento hasta alcanzar al menos entre 10 y 15 nudos antes de realizar el segundo injerto, prueba de NCM-ELISA y registro de síntomas para la confirmación de resultados.
13. Después de la prueba inicial de virus, las accesiones positivas son sometidas a un proceso de eliminación de virus.
14. Los clones libre de patógenos son multiplicados e incluidos en el banco de germoplasma <i>in vitro</i> como HS2.
Eliminación de virus: termoterapia, aislamiento de meristemos y cultivo.
15. Multiplicar el stock de plántulas HS0 en cuatro tubos de ensayo de 25x150mm con medio MPB, colocando dos explantes en cada tubo.
16. La plántulas <i>in vitro</i> de 10 a 15 días de edad son sometidas a termoterapia a 35-37°C durante 1 mes.
17. Ocho meristemos, entre 02-0.35mm de largo son excisados y cultivados en tubos de ensayo de 13x100mm conteniendo medio de meristemos 1 (MM1) (Tabla 1).
18. Los meristemos son subcultivados con medio MM1 a 3 y 6 días después de ser excisados, luego ellos son subcultivados cada 15 días con medio MM3 (Tabla 1) hasta que se obtenga una plántula enraizada con al menos tres nudos.
Prueba sanitaria
19. Después que las plántulas son obtenidas del cultivo de meristemos, ellas son propagadas y evaluadas de acuerdo a lo descrito anteriormente para detectar alguna infección de virus.
20. Las accesiones que resulten libre de patógenos son multiplicadas e incluidas en el banco de germoplasma <i>in vitro</i> como HS2. La verificación de identidad debe ser llevada a cabo en estos materiales antes de su distribución.
21. Las accesiones que resulten positivas a virus deben entrar nuevamente a un proceso de limpieza. (Termoterapia y cultivo de meristemos).

Tabla 1. Multiplicación y composición del medio de meristemos para el cultivo *in vitro* de camote.

	MPB	MM1	MM3
Sales MS (g/L)	4.3	4.3	4.3
Acido ascórbico (g/L)	0.2	0.1	0.1
Nitrato de calcio (g/L)	0.1	0.1	0.1
Pantotenato de calcio (mg/L)	2	2	2
Acido Giberélico (mg/L)	10	20	10
L-Arginina (g/L)	0.1	0.1	0.1
Putrescina-HCl (mg/L)	20	20	20
Sucrosa (g/L)	30	30	30
Leche de coco (mL/L)	—	10	10
Agar (g/L)	—	6	6

Fitogel (g/L)	3	—	—
pH	5.7	5.7	5.7

Nombre de virus

SPFMV: *Sweetpotato feathery mottle virus*; SPLV: *Sweetpotato latent virus*; SPMMV: *Sweetpotato mild mottle virus*; SPVG: *Sweetpotato virus G*; SPMSV: *Sweetpotato mild speckling virus*; SPCFV: *Sweetpotato chlorotic fleck virus*; C-6 virus; SPCSV: *Sweetpotato chlorotic stunt virus*; SPCaLV: *Sweetpotato caulimo-like virus*; and CMV: *Cucumber mosaic virus*.