

# Virus and bacteria elimination from *in vitro* sweetpotato plants



International Potato Center (CIP)

## Pathogen elimination:

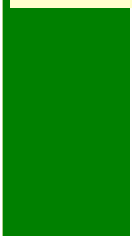
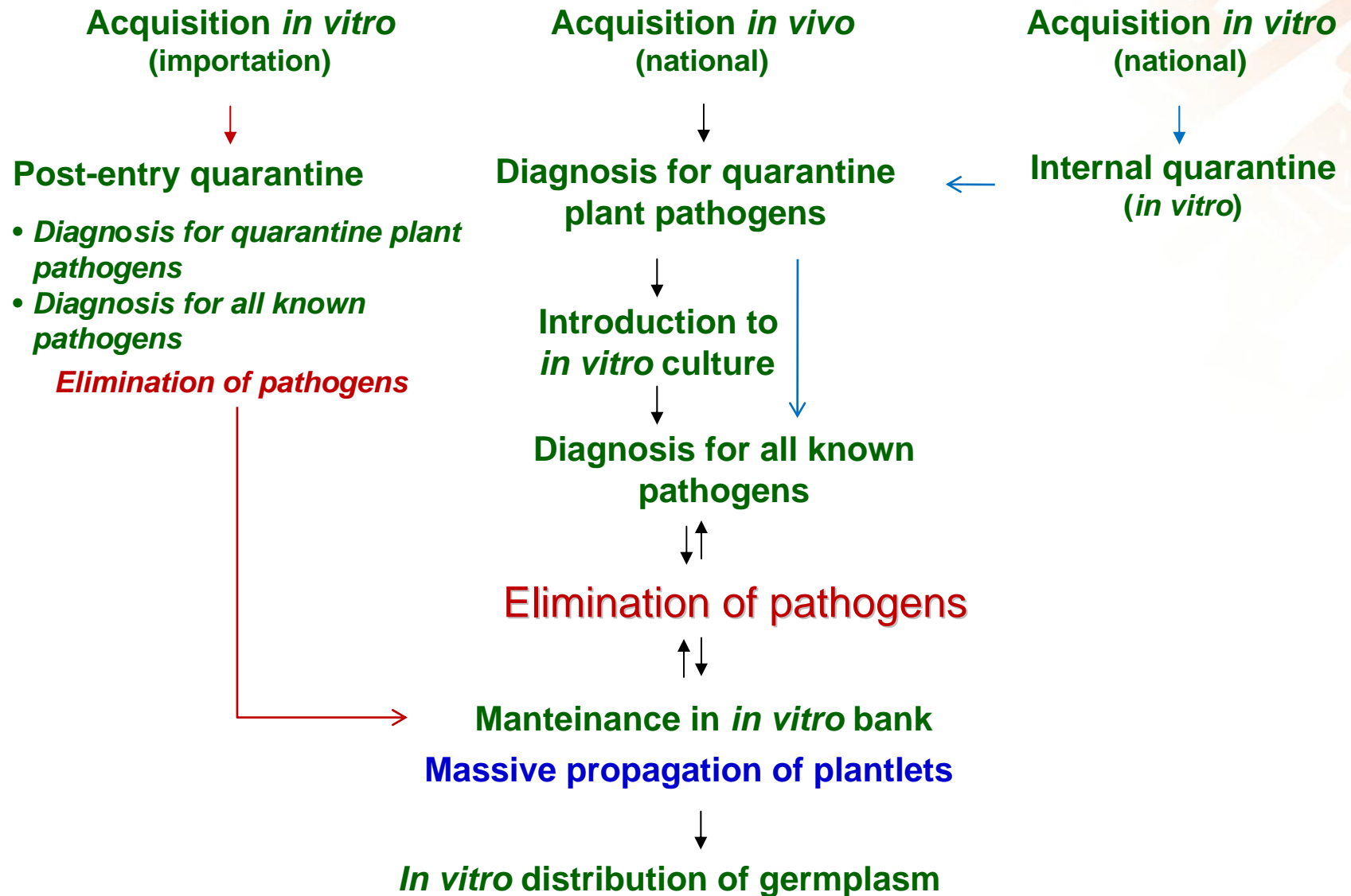
- Contribute to the safe conservation of germplasm
- Allow the production of high quality planting material (virus-free)



•La micropropagación vegetal, o propagación clonal masiva de plantas superiores, posibilita la obtención y cultivo de plantas a gran escala.

- Facilitate the safe movement of the germplasm

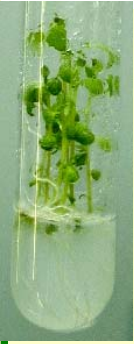
# Management of *in vitro* germplasm





**Virus elimination from sweetpotato plants:**

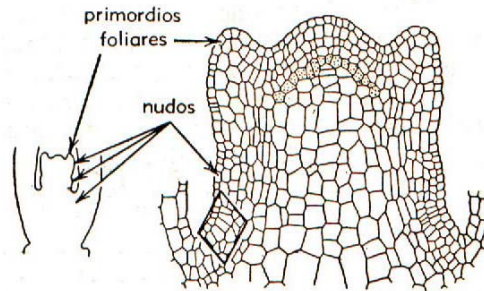
# Techniques for virus eliminations:



## ✓ **Thermotherapy**

- Reduce virus concentration

## ✓ **Meristem culture**



**Meristem:**  
Lacking of  
vascular tissue

**Combination:**

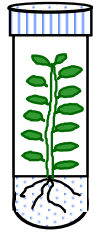
**Highest rate in getting  
virus-free plants**

**Antiviral chemicals**

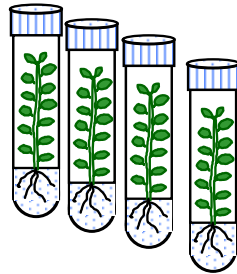
**Cryotherapy**

# Protocol for sweetpotato virus elimination

Plantlet positive  
to virus



Multiplication for  
thermotherapy  
(10-15 days)



**Thermotherapy**



34 - 36°C  
(1 month)

# Thermotherapy conditions

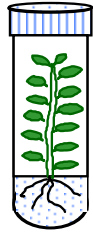


Growth chamber

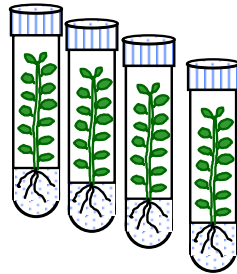
Protocol	Sweetpotato
Thermotherapy	<b>34°C/8h (dark)– 36°C/16h (light)</b> <b>For 4 weeks</b>
Illumination	<b>5,000 lux</b>
Relative humidity	<b>70-80%</b>

# Protocol for sweetpotato virus elimination

Plantlet positive to virus



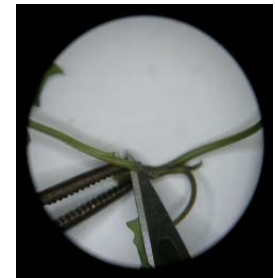
Multiplication for thermotherapy (10-15 days)



Thermotherapy

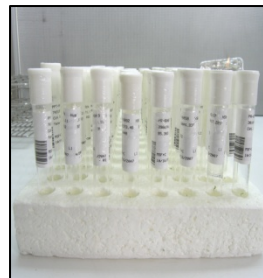


Meristem isolation



34 - 36°C  
(1 month)

Meristem culture (8)



3 - 8 months

Meristem  
(0.3-0.4 mm)

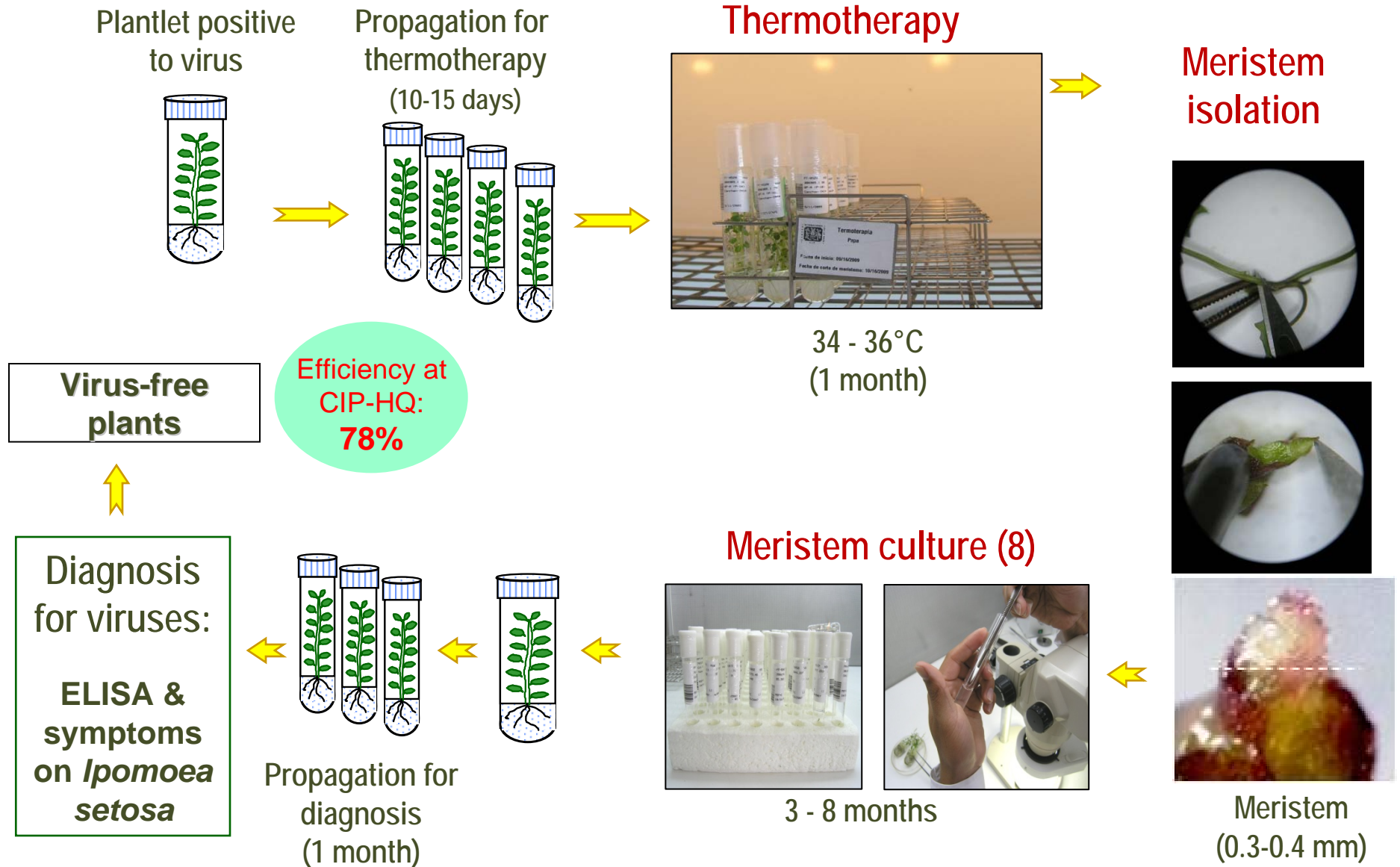


# Medium for meristem culture:



Components	Sweetpotato	
	MM1	MM3
MS salts (g/l)	4.33	4.33
Ascorbic acid (g/l)	0.1	0.1
Calcium nitrate (g/l)	0.1	0.1
Calcium panthotenate (mg/l)	2	2
Gibberellic acid (mg/l)	20	10
L-Arginine (g/l)	0.1	0.1
Putrescine-HCl (mg/l)	20	20
Sucrose (g/l)	30	30
Coconut wather (ml/l)	10	10
Agar (g/l)	6	-
Phytigel (g/l)	-	2.5
pH	5.7	5.7

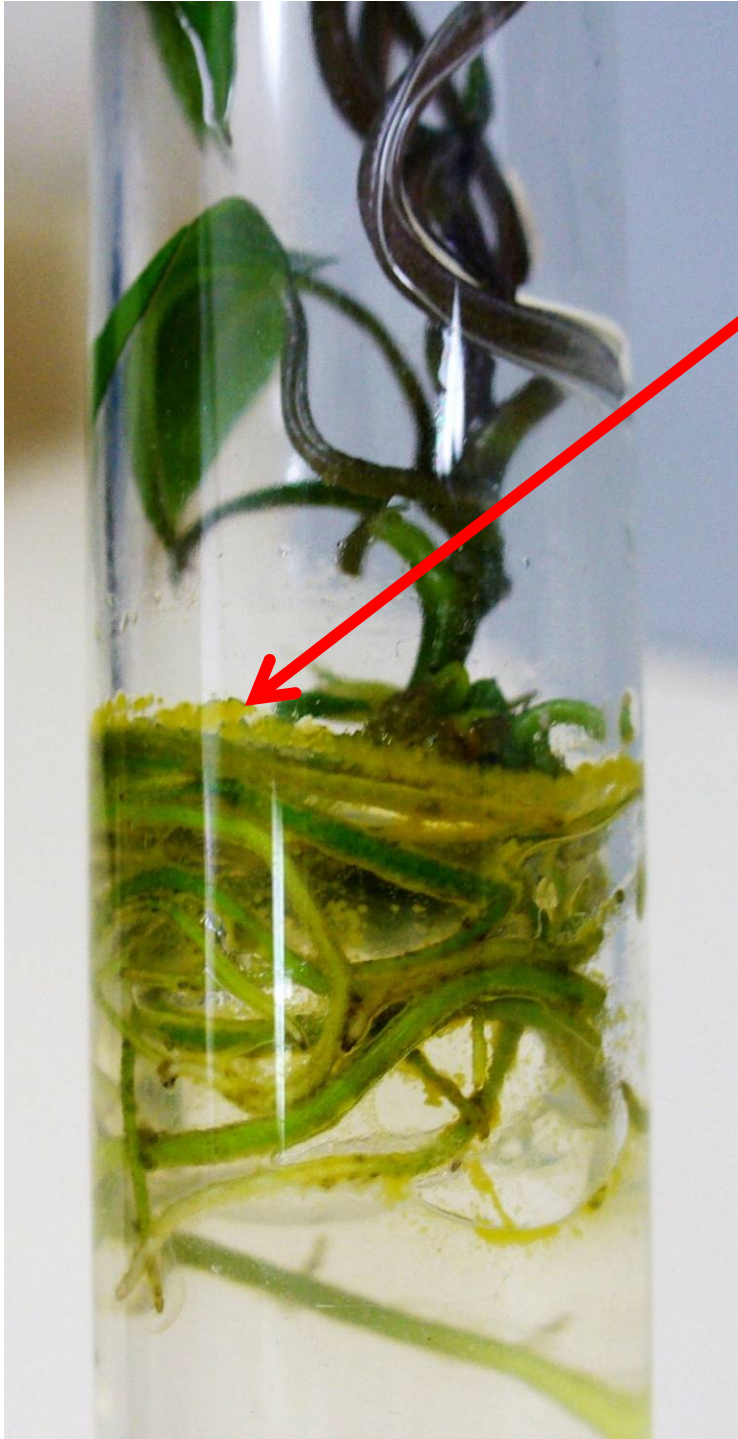
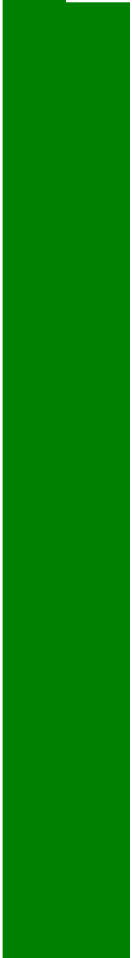
# Protocol for sweetpotato virus elimination





# Bacteria elimination from sweetpotato





Bacteria





## Methods for eliminating bacteria

- ◆ Treatment with antibiotics

Cefotaxime and  
Ceftriaxone  
200 mg / L



Rifampicin  
300 mg /L



- Liquid medium
- Change medium every 2 days

Dosis applied in pieces of filter paper (2-4 weeks)





## Methods for eliminating bacteria

- ◆ Treatment with antibiotics
- ◆ Transplanting to soil and reintroduction to *in vitro*





Transplant in  
jiffy #7



15 days



Diagnosis for  
bacteria  
contamination

(culture in LB 30° C x 72 h  
and  
27 days at RT)

Reintroduction  
to *in vitro*

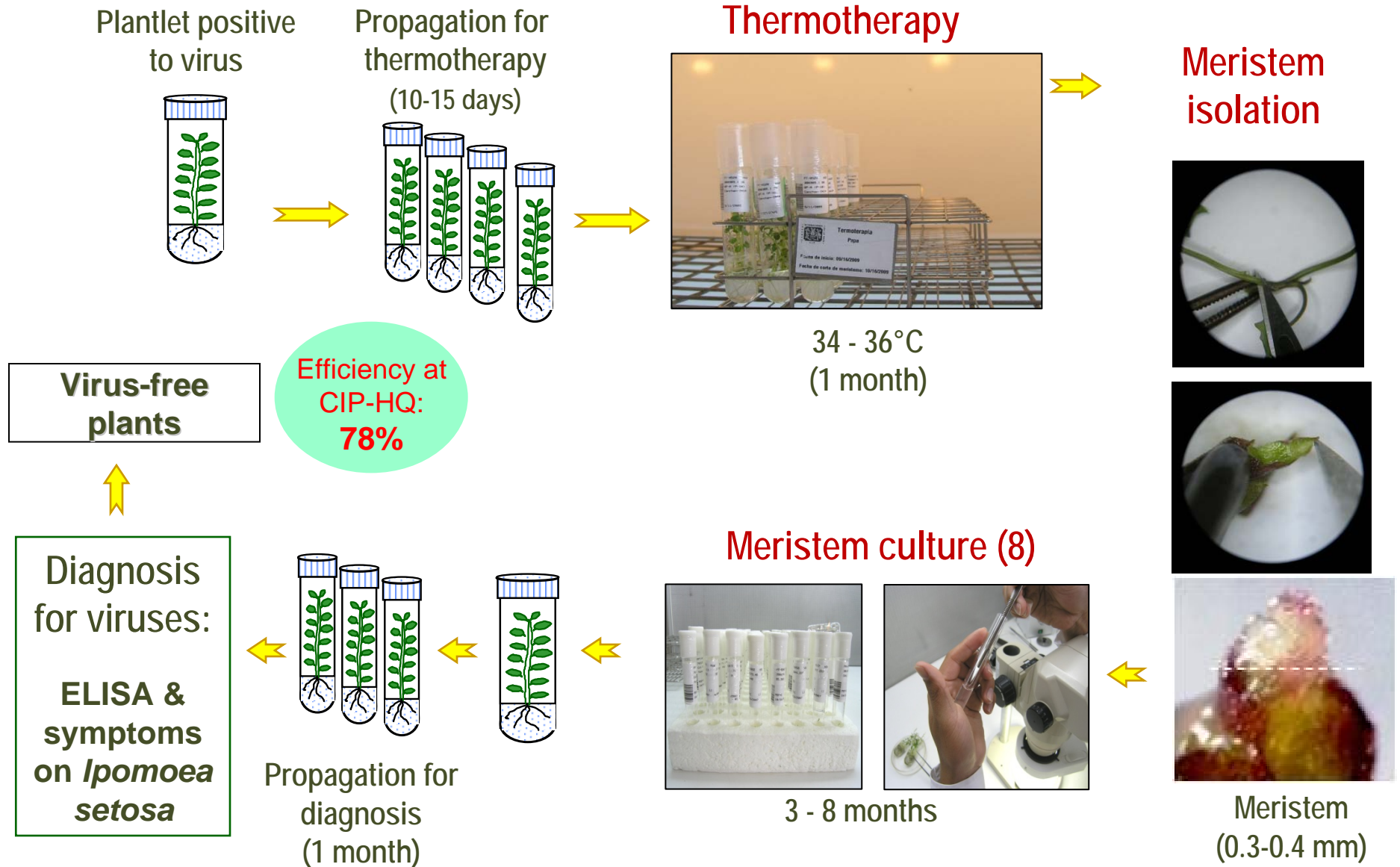
*In vitro* culture  
2 - 4 months

Visual detection  
of contamination



2 months

# Protocol for sweetpotato virus elimination



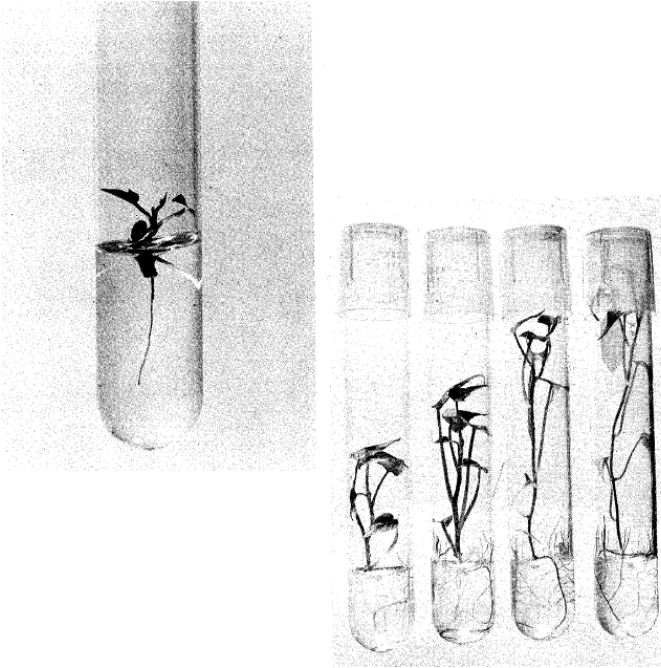
## ***In vitro* Massive Multiplication of sweetpotato**

- CIP-HQ has no a specific protocol.
- To accelerate multiplication it is recommended to add to medium: gibberellic acid and coconut water.
- Could try the following medium:

- MS salts	4.33 g/l
- Ascorbic acid	0.2 g/l
- Calcium nitrate	0.1 g/l
- Gibberellic acid	10 mg/l
- Calcium panthotenate	2 mg/l
- L-Arginine	0.1 g/l
- Putrescine-HCl	10 mg/l
- Sacarose	30 g/l
- Coconut water	10 ml/ l (sterelized by filtration and added after autoclaving)
- <b>Phytigel</b>	<b>2.5 g/l</b>
pH	5.7

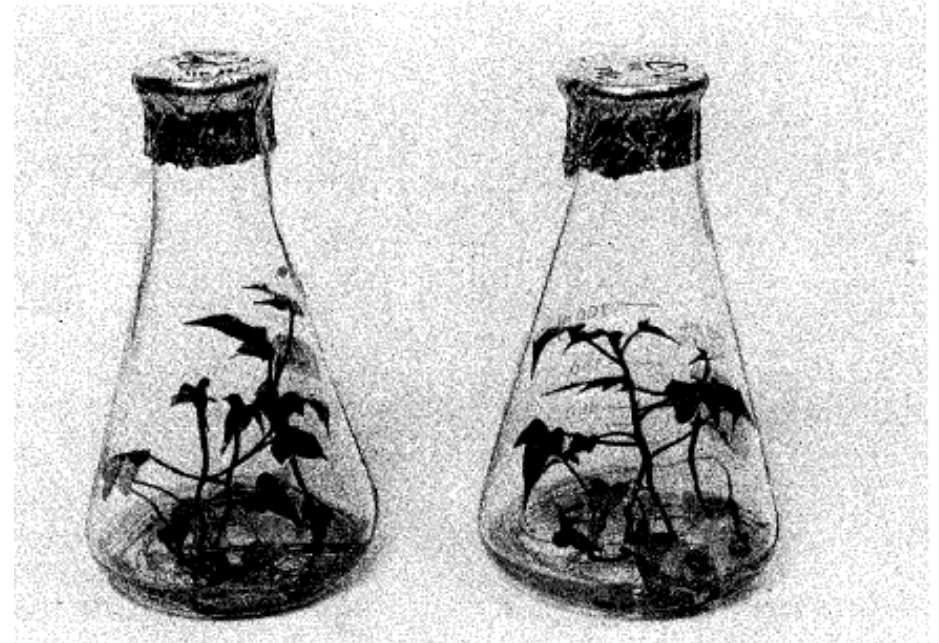
# Micropropagation

Get a large number of clonal plants in a short period



## Growing plants from a node

(each node generates a new plantlets in 6 weeks)



## Liquid medium for rapid propagation

(stem segments with 5 to 8 nodes, growing of plants between 3 to 4 weeks. Agitation may accelerate and promote the development of new plantlets)

**Temperature:** 23-25°C  
**Illumination:** 3,000 lux  
**Photoperiod:** 16h

# Procedure for in vitro propagation



## Medio para conservación (MPB-con) de camote *in vitro*

Componentes	Volumen de medio a preparar		
	1 litro	2 litros	4 litros
Sales MS * (Proveedor CAISSON)	4.33 g	8.66 g	17.32 g
Pantotenato de Calcio	2 mg	4 mg	8 mg
Nitrato de Calcio	100 mg	200 mg	400 mg
L-Arginina	100 mg	200 mg	400 mg
Acido ascórbico	200 mg	400 mg	800 mg
Putrescina HCl	20 mg	40 mg	80 mg
Sacarosa	30 g	60 g	120 g
Phytigel	3 g	6 g	12 g
PH	5.7	5.7	5.7

\* Sales basales de Murashige y Skoog (1962) – Proveedor CAISSON

## Medio para cultivo de meristemas I de camote: fase inicial (MPM1)

Componentes	Volumen de medio a preparar		
	1 litro	2 litros	4 litros
Sales MS * (Proveedor CAISSON)	4.33 g	8.66 g	17.32 g
Pantotenato de Calcio	2 mg	4 mg	8 mg
Nitrato de Calcio	100 mg	200 mg	400 mg
L-Arginina	100 mg	200 mg	400 mg
Acido ascórbico	100 mg	200 mg	400 mg
Putrescina HCl	20 mg	40 mg	80 mg
Acido Giberélico	20 mg	40 mg	80 mg
Agua de coco	10 ml	20 ml	40 ml
Sacarosa	30 g	60 g	120 g
Agar	6 g	12 g	24 g
PH	5.7	5.7	5.7

\* Sales basales de Murashige y Skoog (1962) – Proveedor CAISSON

# COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO

Un adecuado medio de cultivo debe contener :

- Sales Minerales
- Vitaminas
- Reguladores de Crecimiento
- Fuente de Energia: Carbohidratos
- Agente gelificante
- Otros compuestos y/o suplementos orgánicos



Este medio de cultivo artificial debe cubrir los requerimientos nutricionales que las plantas necesitan en condiciones naturales.



## SALES MINERALES

### Macronutrientes

El requerimiento es mayor :

- Nitrógeno      Participa en la producción de vitaminas, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos.
- Fósforo      Importante en los ciclos energéticos. (ATP)
- Magnesio      Formación de clorofila.
- Calcio      Construcción de pared celular. (pectato de calcio)

### Micronutrientes

El requerimiento es menor :

- Yodo      - Molibdeno
- Fierro      - Cobalto
- Manganeso      - Boro
- Zinc      - Cobre

Participan como cofactores en las reacciones metabólicas de las plantas.

## VITAMINAS

Son compuestos orgánicos complejos. Estimulan el crecimiento de los explantes porque intervienen en el metabolismo de la planta.

- Tiamina (Vitamina B1)
- Piridoxina (Vitamina B6)
- Acido nicotínico (Vitamina B5)
- Pantotenato de Calcio
- Inositol
- Ac. Ascórbico (Vitamina C)

## REGULADORES DE CRECIMIENTO

Compuestos orgánicos que en pequeñas concentraciones estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico de la planta.

### Auxinas

#### Efectos

- Alargamiento celular: crecimiento longitudinal de tallos
- División celular: formación de callos
- Promueve el crecimiento de raíces
- Formación de raíces adventicias y laterales
- Dominancia apical
- Crecimiento y maduración de frutos
- Crecimiento de flores
- Actúa en la caída de hojas y frutos

#### Auxinas comunmente usadas

- IAA (ácido indol acético)
- IBA (ac. Indol-3-butírico)
- NAA (ac. Naftalenacético)
- 2,4-D (ac. Diclorofenoxiacético)
- 2,4,5-T (ac. Triclorofenoxiacético)



## REGULADORES DE CRECIMIENTO...

### Citoquininas

#### Efectos

- División celular
- Crecimiento de yemas laterales: Anula dominancia apical
- Retarda la senescencia de las hojas
- Morfogénesis en cultivo de tejidos
- Expansión de hojas

#### Citoquininas comúnmente usadas

- BAP (bencil amino purina)
- Kinetina
- 2-iP (isopentenil adenina)
- Zeatina
- Thidiazuron



## REGULADORES DE CRECIMIENTO...

### Giberelinas

Existen más de 20 giberelinas, la más usada es la AG3

#### Efectos

- Crecimiento de tallos
- Producción enzimática durante la germinación
- Inducción de la germinación de la semilla
- Crecimiento del fruto

### Acido abscísico (ABA)

#### Efectos

- Inhibidor de crecimiento de tallos
- Inhibe germinación de semillas
- Mantiene la dormancia de yemas y brotes

### Etileno

Es un compuesto gaseoso. Se usa ethrel o etephon (ácido 2-cloroetilfosfónico) que libera etileno en condiciones in vitro.

#### Efectos

- Mantiene la dormancia de yemas y brotes
- Abscisión de hojas
- Senescencia de hojas y flores



## FUENTE DE ENERGIA: CARBOHIDRATOS

Las plantas in vitro tienen poca capacidad de sintetizar su propia fuente de energía ya que no son autotrofas, por lo que necesitan que en el medio de cultivo se añada algún tipo de carbohidrato que se lo brinde.

- Sucrosa (+ Usado)
- Maltosa
- Glucosa
- Rafinosa, etc.

## AGENTES GELIFICANTES

Sirven para evitar que la plántula esté sumergida en el medio y como soporte para que ésta se mantenga en forma vertical dentro del envase. Es un material inerte no interacciona con los demás componentes del medio

- Agar : extraído de algas marinas. Puede tener sustancias tóxicas para la plántula
- Phytigel: forma geles claros, puede producir vitrificación
- Agargel : gel claro, no produce vitrificación



La concentración y calidad del agar puede tener efectos importantes en el desarrollo de la planta (i.e crecimiento lento)

## OTROS COMPONENTES

### Aminoácidos:

L-arginina, L-asparragina, L-serina, L-tirosina, L-glutamina

### Complejos naturales:

- Endospermo de coco (Agua de coco)
- Endospermo de maiz
- Pulpa de plátano
- Extracto de malta
- Jugo de tomate
- Extracto de levadura

Se usan como complemento nutricional para un buen crecimiento y desarrollo, son fuente de vitaminas, minerales y algunos reguladores de crecimiento.

### Poliaminas :

Putrescina, Espermidina y Espermina.

- Efectos :**
- Regeneración de raíces, tallos y embriones
  - Retrasa la senescencia
  - Regula la floración

## OTROS COMPONENTES...

### Ascorbic acid

Se usa como como antioxidante, evita la fenolización



### Carbón activado :

Adsorbe sustancias del medio que inhiben el crecimiento, como compuestos fenolicos. Adsorbe el etileno. Mejora el crecimiento de las yemas. Sin embargo para fines del banco no se usa porque no permite visualizar si es que ocurre contaminación.

### PVP :

Polivinil pirrolidona

Adsorve las sustancias fenólicas excretadas en el medio de cultivo