

HQU - Sweet Potato Virus Indexing Procedure - OP023

Date: Nov 13, 2012 9:10 PM

URL:

<https://research.cip.cgiar.org/confluence/display/gadc/HQU+++Sweet+Potato+Virus+Indexing+Procedure+>

Table of Contents

1	INTRODUCTION	4
2	SCOPE	5
3	SAFETY	6
4	MATERIALS	7
5	PROCEDURE	8
5.1	INTERNAL QUALITY CONTROL	10
6	INTRODUCCIÓN	11
7	ALCANCE	12
8	SEGURIDAD	13
9	MATERIALES	14
10	PROCEDIMIENTO	15
10.1	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	17

TITLE	HQU - Sweet Potato Virus Indexing Procedure - OP023
OWNER	Head Virology – Sweetpotato Unit
APPROVER	Head HQU
APPROVAL DATE	
ISSUE DATE	Sep 10, 2012 16:14
CONTRIBUTORS	Fuentes, Segundo (CIP)
CITATION	023
KEYWORDS	accredited , procedure , head_virology , s_fuentes
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP023
VERSION NUMBER	75
SPANISH VERSION	

INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP			
GADC Logo			
Version	Date	Author	Comment
75	Sep 10, 2012 16:14	Hirahoka, Daniel (CIP)	
74	Sep 10, 2012 15:56	Hirahoka, Daniel (CIP)	
73	May 17, 2012 08:18	Simon, Reinhard (CIP)	
72	May 17, 2012 02:25	Fuentes, Segundo (CIP)	
71	May 17, 2012 02:10	Fuentes, Segundo (CIP)	

1 INTRODUCTION

Virus indexing combines knowledge of viruses with methodologies for their detection to assure the effective safe movement of sweetpotato germplasm.

Due to low virus titers and the absence of symptoms from single infections in sweetpotato by most viruses, grafting onto indicator plants is often required to boost titers and detect viruses reliably. The commonly used indicator plant is *Ipomoea setosa*, which is susceptible to viruses infecting sweetpotato.

This standard procedure has been established based on current information for virus testing of sweetpotato germplasm, with the recognition that it will need to be revised as new information becomes available. The procedure includes symptomatology in sweetpotato plants grown in greenhouse (pots), as well as in *Ipomoea setosa* plants grafted with scions of the basal part of sweetpotato. Virus detection and identification is confirmed by serology with antisera available to known viruses. A second round of the process is usually carried out to confirm results.

2 SCOPE

Grafting allows transmission of all viruses. Most sweetpotato viruses infect *Ipomoea setosa* causing visible symptoms and reaching higher concentrations, thus facilitating their detection by serological (NCM-ELISA) or molecular (PCR) tests. Scions for grafting taken from the lower part of the sweetpotato plant have the highest probability of containing virus for testing. [Factors that could affect reliability for virus detection in sweetpotato](#)

3 SAFETY

A laboratory coat should be worn at all times when working in the greenhouse or laboratory.
New razor blades should be used when grafting per accession to minimize contamination.
Preventive spraying of insecticide every 2 weeks for good controlling of insect vectors (e.g. whiteflies, aphids) of viruses into the greenhouse.
Wear dry and clean gloves and/or use forceps when manipulating the nitrocellulose membrane during serological tests.

4 MATERIALS

See lists of materials in the procedures for [Indicator plant diagnostic procedure - OP22](#) and [NCM-ELISA procedure - OP21](#)

5 PROCEDURE

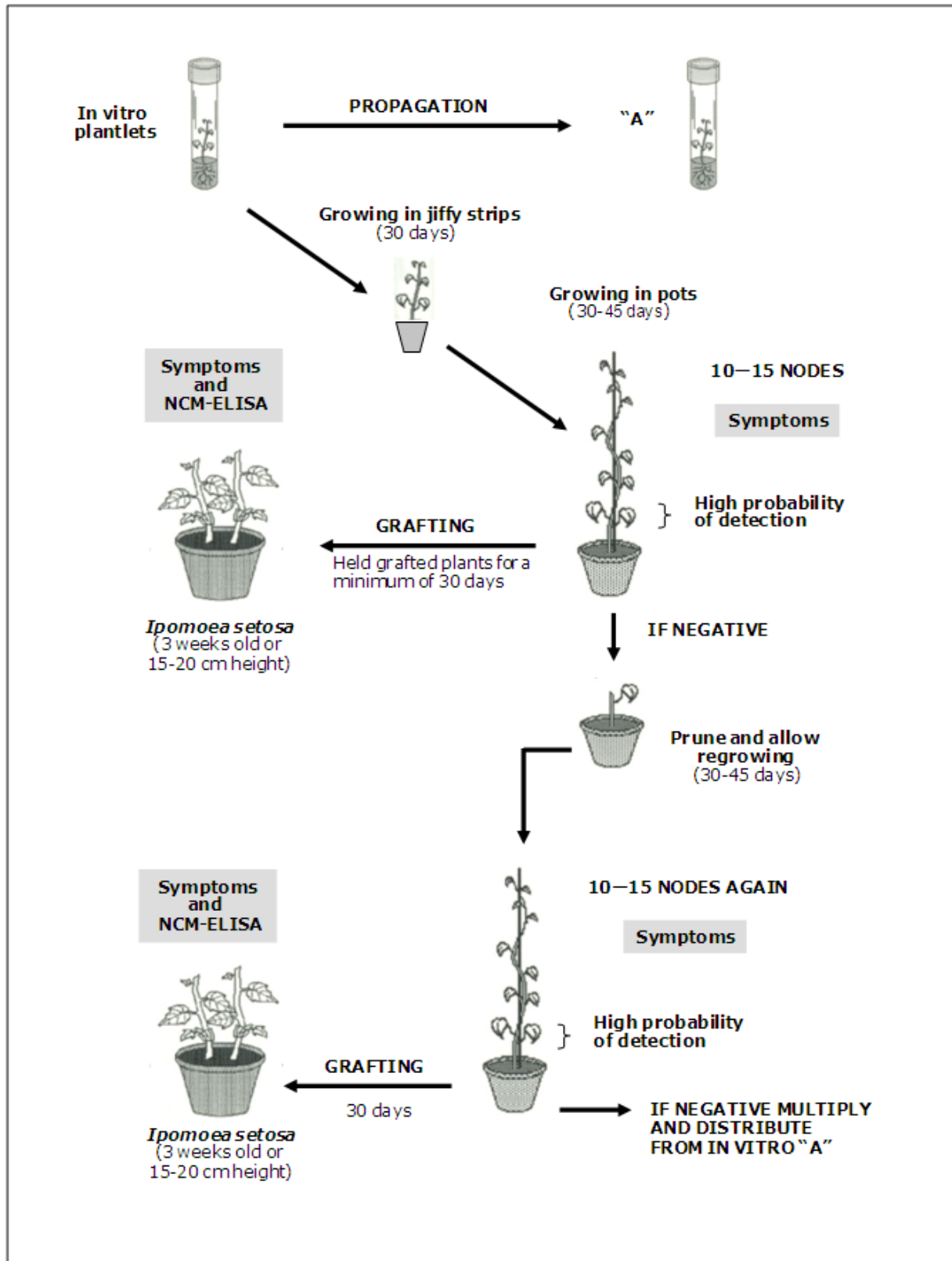


Figure 1. Indexing procedure for sweetpotato viruses. NCM-ELISA is performed for 10 viruses (SPFMV, SPLV, SPVG, SPMSV, SPMMV, SPCSV, SPCFV, C-6, SPCV, and CMV).

Grow the *in vitro* plantlets in jiffy strips for 30 days, and then in a pot for 30-45 days in an insect-free greenhouse until their stem has at least 10-15 nodes.

During the growing period, observe the sweetpotato plant twice for any symptoms (see [FAO guidelines](#) or [CIP Sweetpotato virus symptom guidance material](#) for sweetpotato symptoms). Symptoms are checked when the plant is grafted and 1 month after grafting. Record results of symptoms expression on the [Sweetpotato summary record sheet](#). Transfer any recorded symptom and its digital image to the corporate server through wireless LAN using a hand held computer.

Make grafts of two nodes from the basal part of each sweetpotato plant to two separated three-week-old *I. setosa* plants (both growing together in a pot).

Hold grafted *I. setosa* plants for a minimum of 30 days for observation of symptom expression three times at 10, 20, and 30 days after grafting (see [FAO guidelines](#) or [CIP Sweetpotato virus symptom guidance material](#) for sweetpotato symptoms). Record symptoms, if any observed, on the [Sweetpotato summary record sheet](#). Transfer any recorded symptom and its digital image to the corporate server through wireless LAN using a hand held computer.

A month after grafting, assay the *I. setosa* plants by NCM-ELISA test with available antisera (Sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV), Sweetpotato mild mottle virus (SPMMV), Sweetpotato latent virus (SPLV), Sweetpotato mild speckling virus (SPMSV), Sweetpotato virus G (SPVG), Sweetpotato chlorotic fleck virus (SPCFV), C-6 virus (C-6), Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), Sweetpotato collusive virus (SPCV; former name: Sweetpotato caulimo like virus, SPCaLV), and Cucumber mosaic virus (CMV)). Record results on the [NCM-ELISA record sheet](#) and on the [Sweetpotato summary record sheet](#). Transfer the NCM-ELISA results to the corporate server through wireless LAN using a hand held computer. Pruned negative sweetpotato plants are grown to at least 10-15 nodes before doing a second round of grafting, NCM-ELISA test, and recording symptoms to confirm results. Record of symptoms expression and NCM-ELISA results are done as previously on the [NCM-ELISA record sheet](#) and on the [Sweetpotato summary record sheet](#). Transfer the NCM-ELISA results to the corporate server through wireless LAN using a hand held computer.

If all tests are negative, plantlets originated from the same meristems are approved for distribution.

5.1 INTERNAL QUALITY CONTROL

Both source and indicator plants should be grown in a greenhouse in as near optimal conditions as possible (at 25°±4°C with 85 - 278 µmol/m².seg (10,000 - 15,000 lux) light intensity) to stimulate rapid and luxuriant growth.

To confirm success on grafting, some stems from one healthy *I. setosa* and scions from a SPFMV-infected sweet potato plant are grafted on to *I. setosa* plants as negative and positive controls, respectively. Both controls are used for each batch of grafts.

For NCM-ELISA, the last six spaces for dots on the membranes are used for controls (two for buffer, two for negative and two for positive controls).

Further information on quality control is given in [Indicator plant diagnostic procedure - OP22](#) and [NCM-ELISA procedure - OP21](#).

6 INTRODUCCIÓN

El indexado de virus combina el conocimiento que se tiene sobre los virus con los métodos de detección existentes para asegurar el movimiento seguro efectivo del germoplasma de camote.

Debido a la concentración baja de los virus y a la ausencia de síntomas en infecciones simples por la mayoría de virus en el camote, el injerto a una planta indicadora es a menudo requerido para que la concentración de los virus se incremente y se detecten confiablemente. La planta indicadora comunmente usada es *Ipomoea setosa*, la cual es susceptible a los virus que infectan al camote.

Este procedimiento modelo ha sido establecido basado en información actualizada sobre los virus analizados en el germoplasma de camote, con el reconocimiento de que necesita ser revisado conforme información nueva llega a estar disponible. El procedimiento incluye registro de síntomas que se aprecian en las plantas de camote que se encuentran creciendo en el invernadero (macetas), así como también en las plantas de *Ipomoea setosa* injertadas con porciones de tejidos de la parte basal de los camotes. La detección e identificación de virus es confirmada mediante pruebas serológicas utilizando antisueros disponibles para los virus conocidos. Los resultados son usualmente confirmados a través de una segunda ronda en el proceso.

7 ALCANCE

El injerto permite la transmisión de todos los virus. La mayoría de virus de camote infectan a *Ipomoea setosa* causando síntomas visibles y alcanzando altas concentraciones en sus tejidos, facilitando así su detección por pruebas serológicas (NCM-ELISA) o moleculares (PCR, RT-PCR). Las porciones de tejido que son tomados de la parte baja de la planta de camote tienen una mayor probabilidad de contener virus para su análisis. [Factores que afectan la confiabilidad en la detección de los virus de camote](#)

8 SEGURIDAD

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

Cuando se realicen los injertos se deben usar hojas de afeitar nuevas por cada accesión para minimizar la contaminación.

Aplicaciones preventivas de insecticida cada 2 semanas para un buen control de insectos vectores de virus (ejemplo: moscas blancas, áfidos) dentro de los invernaderos.

Usar guantes descartables limpios y secos y/o usar pinzas cuando se manipule las membranas de nitrocelulosa durante las pruebas serológicas.

9 MATERIALES

Ver las listas de materiales en los procedimientos para [Diagnosis con planta indicadora - OP22](#) y [Procedimiento de NCM-ELISA - OP21](#)

10 PROCEDIMIENTO

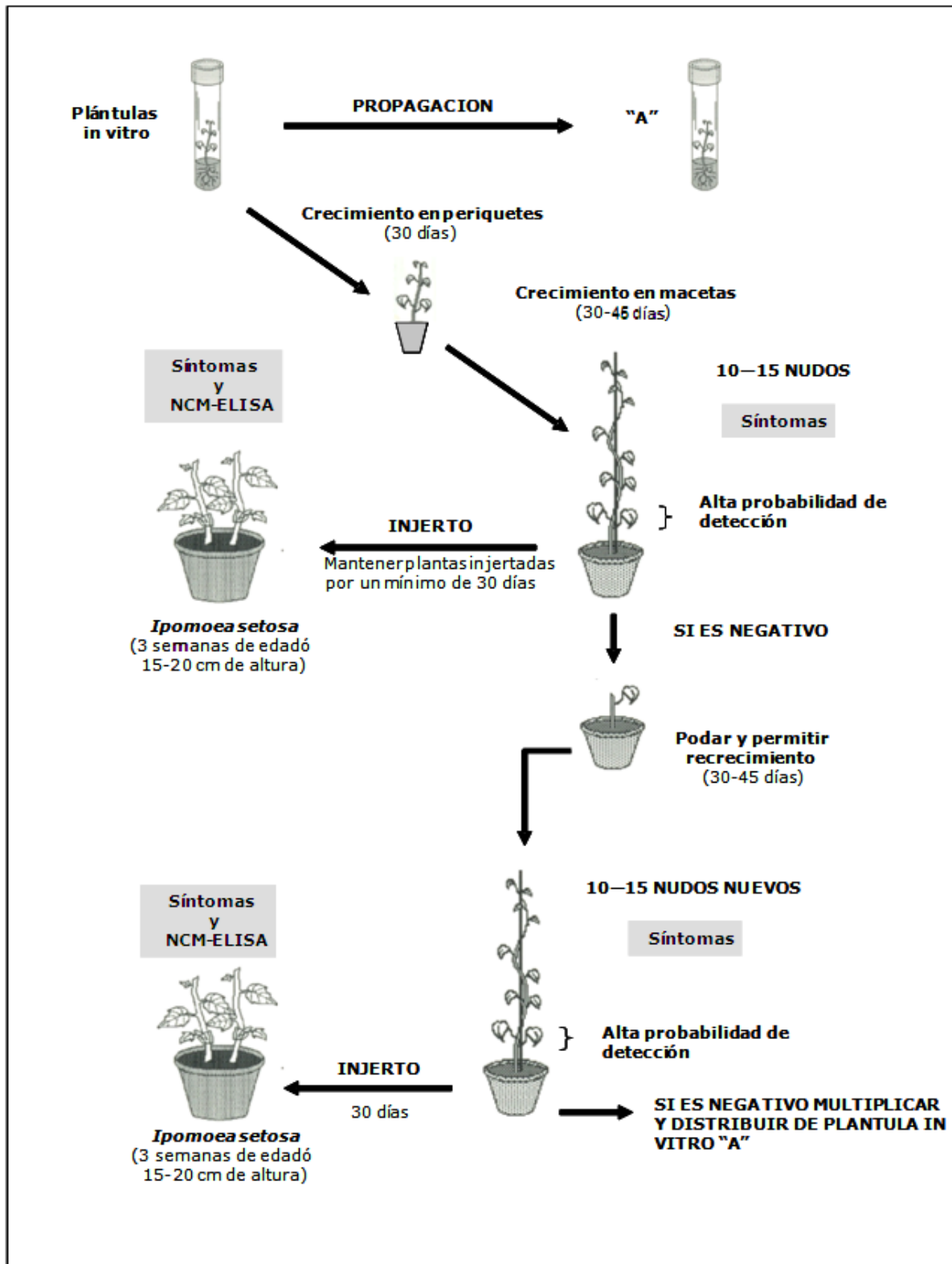


Figura 1. Procedimiento de indexado para virus de camote. NCM-ELISA es realizado para detectar 10 virus (SPFMV, SPLV, SPVG, SPMSV, SPMNV, SPCSV, SPCFV, C-6, SPCV y CMV).

Hacer crecer las plántulas *in vitro* en periquetes (jiffy strips) por 30 días, y luego en macetas por 30-45 días en invernaderos a prueba de insectos hasta que sus tallos tengan al menos 10-15 nudos.

Durante el período de crecimiento, observar hasta en dos oportunidades las plantas de camote por algún síntoma (ver [Guías de la FAO](#) o [Material de guía de síntomas virales en camote del CIP](#) para síntomas en camote). Los síntomas en las plantas son observados durante el injerto y 1 mes después del injerto. Registrar los resultados de la expresión de síntomas en el [Hoja de registro resúmen de camote](#). Transferir los síntomas registrados y sus imágenes digitales al servidor corporativo a través del LAN inalámbrico usando una computadora de mano (pocket).

Hacer injertos de dos nudos de la parte basal de cada planta de camote a plantas separadas de *I. setosa* de 3 semanas de edad (ambas creciendo juntas en una misma maceta).

Mantener las plantas de *I. setosa* injertadas por un mínimo de 30 días para observar la expresión de síntomas tres veces a los 10, 20 y 30 días después de injertadas (ver [Guías de la FAO](#) o [Material de guía de síntomas virales en camote del CIP](#) para síntomas en camote) y registrar los síntomas, si hubiera alguno, en el [Hoja de registro resúmen de camote](#). Transferir los síntomas registrados y sus imágenes digitales al servidor corporativo a través del LAN inalámbrico usando una computadora de mano (pocket).

Un mes después del injerto, las plantas de *I. setosa* son analizadas mediante la prueba de NCM-ELISA con antisueros disponibles (Sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV), Sweetpotato mild mottle virus (SPMMV), Sweetpotato latent virus (SPLV), Sweetpotato mild speckling virus (SPMSV), Sweetpotato virus G (SPVG), Sweetpotato chlorotic fleck virus (SPCFV), C-6 virus (C-6), Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV), Sweetpotato collusive virus (SPCV; former name: Sweetpotato caulimo like virus, SPCaLV) y Cucumber mosaic virus (CMV)). Registrar los resultados en el [Hoja de registro de NCM-ELISA](#) y en el [Hoja de registro resúmen de camote](#). Transferir los resultados de NCM-ELISA al servidor corporativo a través del LAN inalámbrico usando una computadora de mano (pocket). A las plantas de camote negativas podadas se les deja crecer hasta que lleguen a tener al menos 10-15 nudos antes de realizar la segunda ronda de injertos, de pruebas de NCM-ELISA, y registro de síntomas para confirmar los resultados. Registrar la expresión de síntomas y los resultados de NCM-ELISA como antes en la [Hoja de registro de NCM-ELISA](#) y en el [Hoja de registro resúmen de camote](#). Transferir los resultados de NCM-ELISA al servidor corporativo a través del LAN inalámbrico usando una computadora de mano (pocket).

Si todas las pruebas son negativas, las plántulas originadas del mismo meristemas son aprobadas por su distribución.

10.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Tanto las plantas de camote como las plantas indicadoras deben crecer en un invernadero tanto como sea posible en óptimas condiciones (a $25^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$ con $85 - 278 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$ (10,000 - 15,000 lux) de intensidad de luz) para estimular un crecimiento rápido y abundante.

Para confirmar el éxito de los injertos, algunas porciones de tallos de una planta sana de *I. setosa* y de una planta de camote infectada con SPFMV son injertadas a plantas de *I. setosa* como controles negativo y positivo, respectivamente. Ambos controles son usados para cada grupo de injertos.

Para NCM-ELISA, los últimos seis espacios para colocación de muestras en las membranas se usan para los controles (dos para el tampón, dos el control negativos, y dos para el control positivo).

Mayor información en el control de calidad se dan en el procedimiento de [Diagnosis con planta indicadora - OP22](#) y [Procedimiento de NCM-ELISA - OP21](#).