


# Introduction of sweetpotato to in vitro culture - OP58

<b>TITLE</b>	Introduction of sweetpotato to in vitro culture - OP58
<b>OWNER</b>	Head_IVU, B.Zea, Sweetpotato_Curator
<b>APPROVER</b>	Head Genebank
<b>APPROVAL DATE</b>	
<b>ISSUE DATE</b>	Sep 13, 2010 19:06
<b>CONTRIBUTORS</b>	
<b>CITATION</b>	
<b>KEYWORDS</b>	accredited , procedure , head_ivu , sweetpotato_curator , b_zea , head_genebank
<b>NEXT REVISION</b>	
<b>DOCUMENT ID</b>	OP58
<b>VERSION NUMBER</b>	40

INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP			
			
Version	Date	Author	Comment
40	Sep 13, 2010 19:06	Brenda Zea	Changed page structure for bilingual format & active version.
39	Sep 13, 2010 17:03	Brenda Zea	
38	Sep 09, 2010 15:07	Rainer Vollmer	
37	Sep 09, 2010 11:16	Brenda Zea	
36	Sep 09, 2010 09:58	Brenda Zea	
35	Sep 08, 2010 13:11	Luis Rojas	
34	Sep 08, 2010 12:22	Brenda Zea	
33	Sep 08, 2010 11:54	Brenda Zea	

## INTRODUCTION

The establishment of tuber crops into *in vitro* culture requires the isolation of vegetative structures (explants) containing buds. Explants should be inoculated in vessels containing a nutritive substrate (culture medium) where buds will grow to become whole plantlets. For the case of sweetpotato, the preferred explant for *in vitro* culture is the apical or axilar bud of the stem. Because plant material may carry superficial contaminants, a surface sterilization process to eliminate microorganisms is conducted. Fungi and bacteria that are not adequately eliminated can grow and contaminate the culture media damaging the explants in culture. The procedure detailed below has been found to reduce contamination to less than 5% on plant material samples taken from potted plants.

## SCOPE

The procedure covers the introduction of sweetpotato crops

## SAFETY

The personal should know the following protocols:

Good practices during in vitro bank activities

Preparation of culture media - OP74

## MATERIALS

	Equipment
Autoclave	Medium dispenser
PHmeter	Analytical balance
Laminar flow chamber	Shakers
Refrigerator	Cultivation growth chamber
Oven	Microwave oven
<b>Other materials</b>	
Glass test tube	Cotton
Petri dishes	Alcohol
Forceps	Burner
Blades	Sterilizer
Saran wrap or Parafilm	Plastig bag
Sodium hypochlorite	
See <a href="#">Preparation of cultivation media procedure</a> for media recipes	

## PROCEDURE

1. Select healthy mother plants grown in pots for 2 months under greenhouse conditions. Previously, plants should be treated with a fungicide chemical, 1 g/L benomil (Farmathe), by spraying. At least one fungicide treatment should be applied 7 days before initiating the process.
2. Remove the leaves from a stem containing at least six buds. Cut stem segments containing one bud each and place them in a paper bag. Avoid the explants wilting after removal.
3. Move the samples to the laboratory and place them in a container with 100-150 mL of disinfecting solution (1 ml/L fenpyroximate (Kenyo), 20 ul/L spiromesifen (Oberon-240SC), 1 g/L benomil (Farmathe), and 1 mL/L of Tween 20) for 10 minutes; this will control mites and fungi. Rinse with running water three times and wash with 150 mL of 70% alcohol for 30-60 seconds.
4. Discard the alcohol and add 100-150 mL of 2.5% sodium hypochlorite solution; wait 15 min.
5. In a laminar flow chamber, remove the samples from the hypochlorite solution and rinse with 100-150 mL sterilized water five times, shaking the container between each cycle. The first and second rinse are done immediately after discarding the hypochlorite solution, the third and fourth rinse are done after 5 minutes and the fifth rinse is done 10 minutes later. In the last cycle do not discard the water.
6. Using sterile forceps, remove all the explants, draw off the excess water and place in a sterilized petri dish.
7. Using a sterile blade, remove tissue bleached by the hypochlorite treatment (the tissue turns white).
8. Place the explant on MIB culture medium (Table 1) in an 18x150 mm test tube. One explant is cultured per vessel. Cultures are incubated in a controlled climate chamber at 23-25°C with a photoperiod of 16 h of light and 8 h dark.
9. After 1 week, cultures are visually evaluated in order to detect bacteria and fungi contamination. All vessels contaminated with bacteria or fungi are incinerated.

10. After 4 to 5 weeks of culture, clones are submitted to the bacteria detection test (Annex 1) using nutritive broth (NB) and are subcultured to one 18x150 mm test tube with conservation medium (MPB) (Table 1).
11. When results of the NB test are obtained, select a vigorous and bacteria negative clone and discard the other tubes.
12. Selected plantlet is subcultured into six 18x150 mm test tubes with MPB culture medium and included in the *in vitro* genebank collection.

**Table 1. Media composition for sweetpotato introduction to *in vitro* culture and micropropagation**

	MM3	MCB
MS salts (g/L)	4.3	4.3
Ascorbic acid (g/L)	0.1	0.2
Calcium nitrate (g/L)	0.1	0.1
Calcium panthotenate (mg/L)	2	2
Gibberellic acid (mg/L)	10	-
L-Arginine (g/L)	0.1	0.1
Putrescine-HCl (mg/L)	20	20
Sucrose (g/L)	30	30
Coconut milk (mL/L)	10	
Agar (g/L)	---	
Phytigel (g/L)	2.8	3
pH	5.7	5.7

## Annex 1

### *In vitro* culture bacteria testing

1. After 30 days of culture, test possible bacterial contamination, culturing plant segments into Nutritive Broth (NB) (Table A) for detecting bacteria growth.
2. Select one test tube per accession and under aseptic conditions, take off plantlet and place on a petri dish.
3. Remove the leaves and roots and cut the stem in 2-3 nodal segments.
4. Isolated explants are transferred to 18 x 150 mm test tubes containing MPB.
5. Residual material (basal part of plantlet) is cut finely until obtaining a mince of plantlet leaves, stems and roots.
6. This mince of residual material and a little portion of culture medium is inoculated into a 16 x 150 mm test tubes containing 3 ml of NB. Include a positive control test tube containing original bacteria-contaminated accession, and a negative control test tube containing only.
7. Incubate the cultures at 30°C for 72 hours. Evaluate bacteria presence at 24, 48 and 72 hours. Negative cultures follow additional culture at room temperature.
8. Cultures showing bacteria growing (cloudiness) in NB indicates that the clone is bacteria positive. Bacteria negative clones must be returned to *in vitro* genebank
9. When tested clone results bacteria positive, testing is repeated with another clone of the same accession.

**Table A. Nutritive broth composition for detection of bacterial contaminants in sweetpotato *in vitro* culture**

Peptone (g/L)	5
Beef extract (g/L)	1
Yeast extract (g/L)	2
Glucose (g/L)	10

Sodium chloride (g/L)	5
pH	7.0

### Preparation of media

1. Mix the ingredients in 1 liter of distilled water
2. Stir until dissolution is complete
3. Measure the pH
4. Distribute 3 ml in 16x150mm test tubes
5. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes
6. Store at 4°C

## INTRODUCCIÓN

La introducción de tubérculos dentro del cultivo *in vitro* requiere el aislamiento de estructuras vegetativas (explantes) conteniendo yemas. Los explantes deben ser inoculados en envases conteniendo sustrato nutritivo (medio de cultivo) donde las yemas crecerán hasta convertirse en plántulas. En el caso del camote, el explante preferido para el cultivo *in vitro* son yemas apicales o axilares del tallo. Debido a que el material vegetal puede contener contaminantes superficiales, se desarrolla un proceso de esterilización de superficie para eliminar los microorganismos. Los hongos y las bacterias que no son eliminados adecuadamente pueden crecer y contaminar el medio de cultivo dañando a los explantes. Se ha encontrado que el procedimiento detallado a continuación reduce la contaminación a menos del 5% en muestras de material vegetal tomadas de plantas crecidas en macetas.

## ALCANCES

Este procedimiento abarca la introducción del cultivo de camote.

## SEGURIDAD

El personal deberá conocer los siguientes protocolos:

[Buenas prácticas durante las actividades en el banco \*in vitro\*.](#)

[Preparación de medios de cultivo - OP74](#)

## MATERIALES

Equipo	
Autoclave	Dispensador de medio
PHmetro	Balanza analítica
Cámara de flujo laminar	Agitadores
Refrigerador	Cámara de crecimiento
Horno	Horno microondas
Otros materiales	
Tubos de prueba de vidrio	Algodón
Placas petri	Alcohol
Pinzas	Mecheros

Hojas de bisturí	Esterilizador
Saran wrap or Parafilm	Bolsas de plástico
Hipoclorito de sodio	
Ver <a href="#">Preparación de medios de cultivo</a> para las recetas de los medios.	

## PROCEDIMIENTO

1. Seleccionar plantas madre cultivadas en macetas durante 2 meses bajo condiciones de invernadero. Previamente, las plantas deberán ser tratadas con un químico fungicida, 1 g/L benomil (Farmathe), por aspersión. Al menos un tratamiento fungicida deberá ser aplicado 7 días antes de iniciar el proceso.
2. Remover las hojas del tallo que contiene como mínimo 6 yemas. Cortar los tallos en segmentos que contengan cada uno una yema y colocarlos dentro de una bolsa de papel. Evitar la marchitez de los explantes luego de ser removidos.
3. Llevar las muestras al laboratorio y colocarlas en un contenedor con 100-150 mL de solución pesticida por 10 minutos (1 ml/L fenpiroximato (Kenyo), 20 ul/L spiromesifen (Oberon-240SC), 1 g/L benomil (Farmathe), y 1 mL/L de Tween 20) ; esto controlará ácaros y hongos. Enjuagar tres veces con agua y lavar con 100-150 mL de alcohol al 70% durante 30 a 60 segundos.
4. Descartar el alcohol y añadir 100-150 mL de hipoclorito de sodio al 2.5%; esperar 15 min.
5. En la cámara de flujo laminar remover las muestras del hipoclorito de sodio y enjuagar con 100-150 mL de agua esteril cinco veces, agitar el contenedor entre cada ciclo. El primer y segundo enjuague son realizados inmediatamente después de descartar la solución de hipoclorito, el tercer y cuarto enjuague son hechos después de 5 minutos y el quinto enjuague se realiza 10 minutos mas tarde. En el último ciclo no descartar el agua.
6. Usando pinzas estériles, remover todos los explantes, extraer el exceso de agua y colocarlos en una placa petri estéril.
7. Usando una hoja de bisturí estéril, remover el tejido quemado por el tratamiento con hipoclorito de sodio (el tejido se vuelve blanco).
8. Colocar el explante en el medio de cultivo MIB (Tabla 1) en un tubo de ensayo de 18x150mm. Un explante es cultivado por envase. Los cultivos son incubados en una cámara con ambiente controlado entre 23 y 25°C con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.
9. Después de una semana, los cultivos son evaluados visualmente para detectar contaminación bacteriana y fúngica. Todas las plántulas y envases contaminados deben ser descartados autoclavándolos.
10. Después de 4 a 5 semanas de cultivo, los clones son evaluados mediante una prueba para detección de bacterias (Anexo 1) utilizando caldo nutritivo (NB) y son subcultivados en un tubo de ensayo de 18x150 mm con medio de conservación (MCB) (Tabla 1).
11. Cuando los resultados de la prueba de NB son obtenidos, seleccionar el clon mas vigoroso negativo para bacterias y descartar los otros tubos.
12. La plántula seleccionada es subcultivada en seis tubos de ensayo de 18x150 mm con medio de cultivo MPB e incluidas en la colección del banco de germoplasma <i>in vitro</i> .

**Tabla 1. Composición del medio de cultivo para la introducción y micropropagación de camote al cultivo *in vitro***

	MIB	MCB
Sales MS (g/L)	4.3	4.3
Ácido ascórbico (g/L)	0.1	0.2
Nitrato de calcio (g/L)	0.1	0.1
Pantotenato de Calcio (mg/L)	2	2
Ácido Giberélico (mg/L)	10	-
L-Arginina (g/L)	0.1	0.1
Putrescina-HCl (mg/L)	20	20
Sucrosa (g/L)	30	30
Leche de coco (mL/L)	10	
Agar (g/L)	---	
Fitogel (g/L)	2.8	3

pH	5.7	5.7
----	-----	-----

## Anexo 1

### Prueba para detección de bacterias en cultivo *in vitro*.

1. Después de 30 días de cultivo, evaluar la posible contaminación bacteriana, cultivar segmentos de planta dentro de Caldo Nutritivo (NB) (Tabla A) para la detección de crecimiento bacteriano.
2. Seleccionar un tubo de ensayo por accesión y en condiciones asépticas retirar una plántula y colocarla en una placa petri.
3. Remover las hojas y raíces y cortar los tallos en segmentos con 2 o 3 nodos.
4. Los explantes aislados son transferidos a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo MPB.
5. El material residual (parte basal de las plántulas) es cortado finamente hasta obtener una picadillo de hojas, tallos y raíces de las plántulas.
6. Este picadillo de material residual y una pequeña porción de medio de cultivo son inoculados en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo 3ml de NB. También se incluye un tubo de ensayo como control positivo, el cual contiene una accesión que originalmente esta contaminada con bacterias, y un tubo de ensayo como control negativo conteniendo solo medio de cultivo.
7. Incubar los cultivos a 30°C por 72 horas. Evaluar la presencia de bacterias a las 24, 48 y 72 horas. Los cultivos negativos continúan su cultivo a temperatura ambiente.
8. Cultivos que muestran crecimiento bacteriano (turbidez) en el medio NB indican que los clones son positivos. Los clones negativos deben ser retornados al banco de germoplasma <i>in vitro</i> .
9. Cuando los clones evaluados resultan positivos para bacterias, las pruebas son repetidas con otros clones de la misma accesión.

**Tabla A. Composición del caldo nutritivo para la detección de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de camote.**

Peptona (g/L)	5
Extracto de carne (g/L)	1
Extracto de levadura (g/L)	2
Glucosa (g/L)	10
Cloruro de sodio (g/L)	5
pH	7.0

### Preparación del medio de cultivo

1. Mezclar los ingredientes en 1 litro de agua destilada.
2. Mezclar hasta disolver completamente.
3. Medir el pH.
4. Distribuir 3 ml en tubos de ensayo de 16x150mm.
5. Esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Guardar a 4°C.