


In vitro multiplication of sweetpotato - OP59

TITLE	In vitro multiplication of sweetpotato - OP59
OWNER	Head_IVU,R.Vollmer
APPROVER	Head Genebank
APPROVAL DATE	
ISSUE DATE	Oct 20, 2010 15:08
CONTRIBUTORS	
CITATION	
KEYWORDS	accredited , procedure , head_ivu , head_genebank , r_vollmer , op59
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP59
VERSION NUMBER	53

INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP			
			
Version	Date	Author	Comment
53	Oct 20, 2010 15:08	Rainer Vollmer	minor changes - formatting
52	Oct 20, 2010 14:23	Rainer Vollmer	formatting
51	Sep 16, 2010 10:14	Rainer Vollmer	orthographical corrections
50	Sep 14, 2010 08:57	Rainer Vollmer	
49	Sep 09, 2010 14:05	Rainer Vollmer	
48	Sep 08, 2010 15:10	Rainer Vollmer	minor format changes
47	Sep 08, 2010 08:56	Rainer Vollmer	minor changes
46	Sep 08, 2010 08:37	Rainer Vollmer	
45	Sep 07, 2010 19:56	Luis Rojas	Authorized by Rainer Vollmer labels & owner
44	Sep 07, 2010 18:35	Luis Rojas	Authorized by Rainer Vollmer

INTRODUCTION

This technique is based on the principle that appropriate culture conditions induce the growth of pre-existent terminal or axillar buds, resulting in a new plantlet. The nutritional and hormonal conditions of the medium break the bud's latency and promote its rapid growth. Callus formation, followed by shoot regeneration, must be avoided because it can affect the genetic integrity of the clone. Following the protocol described below, after 4-5 weeks of *in vitro* culture plantlets may be conserved, multiplied again, or distributed to the national, international y CIP internal consignees.

SCOPE

This procedure covers the multiplication of *in vitro* sweetpotato germplasm for distribution and conservation purposes. The multiplication procedure is realized by a properly qualified technician (or auxiliary technician).

SAFETY

The operative personnel should know the following protocols:

- Preparation of culture media - OP74 (MPB culture medium)
- Good practices during *in vitro* bank activities

MATERIALS

EQUIPMENT	
Autoclave	Medium dispenser
pHmeter	Analytical balance
Laminar flow chamber	Magnetic Stirrer
Refrigerator	Sterilizer
Environmental monitoring device (HOBO Logger)	Microwave oven
OTHER MATERIALS	
Glass test tubes (13x100 mm, 18x150 mm, 25x150 mm)	Cotton
Test tube caps	Labels
Sterile petri dishes	Wash bottle with alcohol (70°)
Forceps	Burner (with alcohol 96°)
Scalpels	Sterile paper sheets
Blades No.10	Racks
Saran wrap or Parafilm	Plastic Beakers (1, 2 and 4 litres)
Spatula	Magenta vessels
Culture medium (MPB)	Glass vessel with alcohol (96°)

PROCEDURE

1. Clean the flow chamber according to the "[Good practices during in vitro bank activities](#)" protocol. Set up the following materials inside the flow chamber: sterile paper or petri dishes, scalpels with blades, forceps, piece of cotton, alcohol, burner and sterilizer.
2. Take the rack with the accessions to be multiplied to the transference room. Register the following information in the data base: type of medium, batch of medium, purpose of propagation (activity), name of technician, future rack location. Print out the labels using the barcode system according to the number of vessels to be propagated.
3. Under aseptic conditions, the plantlets are taken out from the *in vitro* vessel and placed onto a steril petri dish or paper sheet using sterilized forceps (**Figures 1A and 1B**). It is recommended to use 4-5 week-old plantlets grown in MPB propagation medium (**Table 1**) (see [Preparation of culture media - OP74](#) protocol). Each accession is multiplied separately.
4. Using a sterilized scalpel with a No. 10 blade, remove the tip, leaves and roots (**Figure 1C**) and cut the stem into several segments of approximately 1.0 - 1.5 cm, each containing 2 to 3 buds (**Figure 1D**).
5. Colocate one explant per 13x100 mm tube (national and international distribution), two per 25x150 mm tube (sub-culture, and CIP internal distribution), two per 18x150 mm tube (conservation activity), or five per magenta vessel (CIP internal distribution). Place the explants on the surface of fresh-sterilized MPB propagation medium, maintaining the bud facing upwards (**Figure 1E**).
6. Discard the paper sheet and the plant remains after the multiplication of each accession. Cap and seal the tubes or magenta vessels with a gas-permeable plastic tape (Saran wrap or Parafilm) and label correctly (**Figure 1F**). Use for each accession a new paper sheet. Sterilize the tools after each accession placing them in the sterilizer for at least 30 seconds.
7. Cultures are transferred to the culture incubation room, in which can be found the following controlled physical environment conditions : temperature of 23-25±1 °C, photon flux density (PFD) of 45 mol/(m².seg), with a 16h/8h photoperiod of light and darkness. The environment of the culture incubation chamber is monitored according to a predefined programme. Equipment performance is also checked. The details of environmental and equipment monitoring can be found at the following protocol: [Equipment and environment monitoring \(OP71\)](#). (*)
8. After 5 days of culture, visually evaluate the plantlets for bacteria/fungi contamination, also verify correct labeling, correct number of vessels per accession, and correct number of plants per vessel. Record the evaluation data in the IVU-database. Plantlets showing signs of contamination are discarded and sterilized by autoclaving.
9. After 14 days of culture, visually evaluate the viability of the plantlets (**Table 2**). Record the evaluation data in the IVU-database. Plantlets with abnormal growth are discarded and sterilized by autoclaving.
10. Distribution activity: Perform on delivery date to ADU a visual quality check of the plant material. Record the evaluation data in the IVU-database. Plantlets with normal development are ready for their transfer to ADU.
(*) Illuminance is constantly checked using an environmental monitoring device (HOBO logger). Fluorescents with low illuminance capacity are replaced by new ones (after 3,000 h of use approximately).

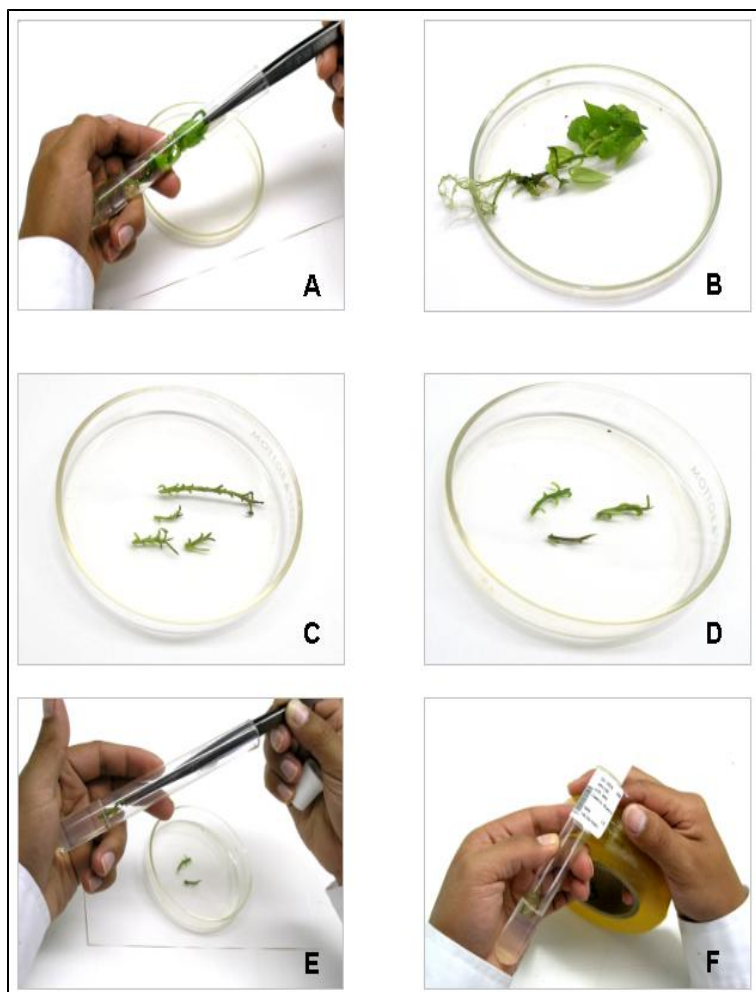


Figure 1. Procedure of sweetpotato *in vitro* multiplication. **A)** Extraction of material. **B)** Colocation of the mother plant(s) on petri dish o steril paper. **C)** Removing of tip, leafs, and roots. **D)** Cutting of segments (with 2-3 buds per segment). **E)** Colocation of the explants in fresh MPB medium. **F)** Sealing and labelling of the tube(s)

Table 1. Composition of MPB medium

Ingredient	Quantity (per litre)
MS salts*	4.33 g
Ascorbic acid	200 mg
Calcium nitrate	100 mg
Calcium panthotenate	2 mg
L-Arginine	100 mg
Putrescine-HCl	20 mg
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g
pH	5.7
*Murashige and Skoog basal Salts (1962) Supplier: CAISSON	

Table 2. Indicators for viability of *in vitro* sweetpotato plantlets.

General Aspect	Chlorosis	Root formation	Necrosis	Vitrification
Good	Absent	Normal	Absent	Absent
Intermediate	Incipient	Intermediate	Incipient	Intermediate
Regular	Intermediate	Poor	Intermediate	High
Dead	High	Absent	High	

INTERNAL QUALITY CONTROL

1. Quality check list (distribution activity).
2. Table of distribution times (distribution activity).
3. Automatic notification 7 days before sending to ADU (distribution activity).
4. Colocation of original and new label onto one of the multiplied tubes (conservation activity).

INTRODUCCION

Esta técnica se basa en el principio de que bajo las condiciones apropiadas de cultivo se induce el crecimiento de una yema terminal o axilar pre-existente, resultando en una nueva plántula. Las condiciones nutricionales y hormonales del medio rompen la latencia de la yema y promueven su rápido crecimiento. La formación de callos, seguido por la regeneración de ápices, debe evitarse por poder afectar la integridad genética del clon. Siguiendo el protocolo descrito líneas abajo, después de 4-5 semanas de cultivo *in vitro*, las plántulas pueden ser conservadas, nuevamente multiplicadas, o ser distribuidas hacia los clientes nacionales, internacionales, y CIP internos.

ALCANCE

El presente protocolo describe la multiplicación del germoplasma *in vitro* de camote con fines de distribución y conservación. La multiplicación para la distribución es realizada por un técnico o técnico auxiliar debidamente capacitado.

SEGURIDAD

El personal operativo debe conocer los siguientes protocolos:

- Preparación de medio de cultivo - OP74 (medio de cultivo MPB)
- Buenas prácticas en las actividades del banco *in vitro*

MATERIALES

EQUIPOS	
Autoclave	Dispensador de medio
pHmetro	Balanza analítica
Cámara de flujo laminar	Agitador magnético
Refrigerador	Esterilizador

Dispositivo de monitoreo ambiental (HOBO)	Microondas
OTROS MATERIALES	
Tubos de ensayo (13x100 mm, 18x150 mm, 25x150 mm)	Algodón
Tapas para tubos de ensayo	Etiquetas
Placas petri estériles	Pizeta con alcohol (70°)
Pinzas	Mechero de alcohol (96°)
Porta bisturís	Pliegues de papel estéril
Hojas de bisturí (Nr. 10)	Gradillas
Saranwrap o Parafilm	Vasos de precipitación de plástico (1, 2, y 4 litros)
Espátulas	Magentas
Medio de cultivo (MPB)	Vaso de vidrio con alcohol (96°)

PROCEDIMIENTO

1. Limpiar la cámara de flujo laminar siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo de "[Buenas prácticas en las actividades del banco in vitro](#)". Colocar los siguientes materiales de trabajo en la cámara de flujo laminar: pliegues de papel estéril, placa petri estéril, bisturís con hoja Nr. 10, pinzas, algodón, pizeta, vaso de vidrio, mechero de alcohol, esterilizador.
2. Transferir la gradilla con las accesiones a ser multiplicadas hacia la sala de transferencia. Registrar en la base de datos: tipo de medio utilizado, lote de medio, propósito de la propagación (actividad), nombre del técnico, futura ubicación de gradilla. Imprimir etiquetas de acuerdo al número de contenedores solicitados utilizando el sistema de código barra.
3. En la cámara de flujo laminar transferir las plántulas con una pinza estéril desde el recipiente *in vitro* original hacia una placa petri o pliegue de papel estéril (**Figura 1A y 1B**). Se recomienda utilizar plántulas madres de 4 a 5 semanas de edad, cultivadas en medio MPB (**Tabla 1**) (ver protocolo: [Preparación de medio de cultivo - OP74](#)). Multiplicar cada accesión separadamente.
4. Remover con un bisturí estéril (Nr. 10) las hojas y raíces de la plántula (**Figura 1C**). Empezando desde el ápice cortar el tallo en segmentos de aprox. 1.0 - 1.5 cm, con 2 a 3 yemas por segmento (**Figura 1D**).
5. Colocar 1 explante por tubo de 13x100 mm (distribución nacional e internacional), 2 por tubo de 25x150 mm (sub-cultivo, distribución CIP interna), 2 por tubo de 18x150 mm (actividad de conservación), y 5 por magenta (distribución CIP interna). Los recipientes contienen el medio de propagación MPB previamente esterilizado. Sembrar los explantes de tal manera que las yemas quedan dirigidas hacia arriba (**Figura 1E**).
6. Utilizar para cada entrada un nuevo pliegue de papel estéril, descartando el pliegue y los residuos de la entrada anterior. Tapar y sellar cada recipiente con cinta plástica permeable al gas (Saran wrap o Parafilm) y etiquetar correctamente (**Figura 1F**). Esterilizar las herramientas al menos por 30 segundos después de cada entrada multiplicada.
7. Transferir las plántulas hacia la sala de incubación, en la cual se establecen las siguientes condiciones físicas controladas: temperatura de 23-25 ± 1°C, densidad de flujo de fotones de 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{seg})$, fotoperiodo de 16h/8h de luz y oscuridad. El ambiente de la sala de incubación se monitorea de acuerdo a un programa predefinido (ver protocolo: "[Monitoreo de equipos y condiciones ambientales](#)" (OP71). (*)
8. Evaluar visualmente la contaminación bacteriana y fúngica (5 días después de la multiplicación). Verificar además: correcto etiquetado, correcto número de plántulas por contenedor, y correcto número de contenedores por entrada. Registrar los datos de evaluación en la base de datos de TCL. Las plántulas que muestran signos de contaminación deben ser descartadas y autoclavadas.
9. Evaluar visualmente la viabilidad de las plántulas (14 días después de la multiplicación) (**Tabla 2**). Registrar los datos de la evaluación en la base de datos de TCL. Las plántulas que muestran signos de contaminación deben ser descartadas y autoclavadas.
10. Actividad de distribución: Al día de entrega a ADU realizar un chequeo visual de la calidad de las plántulas. Registrar los datos de la evaluación en la base de datos de TCL. Las plántulas con desarrollo normal están listas para su transferencia hacia ADU.
(*) La iluminación se controla constantemente vía dispositivos de control ambiental (HOBO). Fluorescentes de baja capacidad luminosa se replazan periódicamente por nuevos (aproximadamente después de 3000 horas de uso).

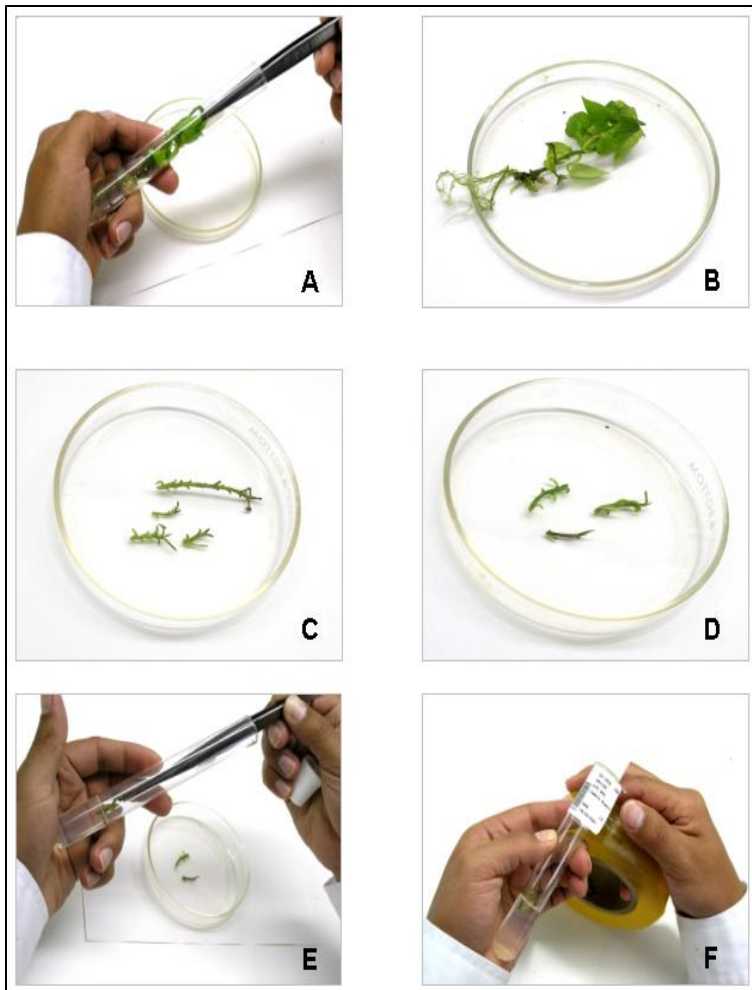


Figura 1. Procedimiento para la multiplicación *in vitro* de camote. **A)** Extracción del material. **B)** Colocación de la(s) planta(s) madre(s) encima de una placa petri o papel estéril. **C)** Retiro de ápice(s), hojas y raíces de la(s) planta(s). **D)** Corte de segmentos (con 2 a 3 yemas por segmento). **E)** Siembra de explantes cortados en medio de cultivo MPB fresco. **F)** Sellado y etiquetado de tubo(s).

Tabla 1. Composición de medio MPB

Compuesto	Cantidad (por litro)
Sales MS*	4.33 g
Acido ascórbico	200 mg
Nitrato de calcio	100 mg
Pantotenato de calcio	2 mg
L-Arginina	100 mg
Putrescina-HCl	20 mg
Sacarosa	30 g
Phytigel	3 g
pH	5.7

*Murashige and Skoog basal Salts (1962)
Proveedor: CAISSON

Tabla 2. Indicadores de la viabilidad de plántulas de camote *in vitro*

Estado general	Clorosis	Formación de raíces	Necrosis	Vitrificación
Bueno	Ausente	Normal	Ausente	Ausente
Medio	Incipiente	Media	Incipiente	Media
Regular	Media	Pobre	Media	Alta
Muerto	Alta	Ausente	Alta	

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

1. Lista de control de calidad (actividad de distribución)
2. Tabla de tiempos de distribución (actividad de distribución).
3. Notificación automática 7 días antes del envío a ADU (actividad de distribución).
4. Colocación de etiqueta original y nueva encima de uno de los tubos multiplicados (actividad de conservación).