

# Genebank - Pathogen elimination of potato - OP017

# Table of Contents

---

|                          |    |
|--------------------------|----|
| ENGLISH VERSION          | 3  |
| INTRODUCTION             | 4  |
| SCOPE                    | 4  |
| SAFETY                   | 4  |
| MATERIALS                | 5  |
| PROCEDURE                | 6  |
| INTERNAL QUALITY CONTROL | 9  |
| REFERENCES               | 10 |
| VERSION EN ESPAÑOL       | 11 |
| INTRODUCCIÓN             | 11 |
| ALCANCE                  | 11 |
| SEGURIDAD                | 11 |
| MATERIALES               | 12 |
| PROCEDIMIENTO            | 13 |
| INTERNAL QUALITY CONTROL | 17 |
| REFERENCIAS              | 17 |

The license could not be verified: License Certificate has expired!

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>TITLE</b>                       | <b>Genebank - Pathogen elimination of potato - OP017</b>   |
| <b>OWNER *</b>                     | Phytosanitary Specialist   |
| <b>APPROVER *</b>                  | Head Genebank  |
| <b>APPROVAL DATE *</b>             | September 17th, 2012   |
| <b>LAST REVIEW DATE *</b>          | September 5th, 2016  |
| <b>REVIEW FREQUENCY *</b>          | 12 Months  |
| <b>ISSUE DATE</b>                  | Dec 13, 2016 08:13   |
| <b>CONTRIBUTORS *</b>              | Zea, Brenda (CIP), Panta, Ana (CIP)  |
| <b>CITATION *</b>                  | 017  |
| <b>KEYWORDS</b>                    | procedure, accredited  |
| <b>DOCUMENT ID *</b>               | OP017  |
| <b>VERSION NUMBER</b>              | v.19   |
| <b>COMPETENT PERSONNEL *</b>       | B.Zea; A.Ynga; M.Ruiz  |
| <b>RELATED CLAUSES</b>             | 5.8  |
| <b>RELATED DOCUMENTS</b>           | RD026; RD008;RD017   |
| <b>CITATION OF THIS DOCUMENT *</b> | Zea,B.; Ynga,A.; Ruiz,M.; Cruzado,J.; Panta,A.; Barkley,N.A.; Ellis,D. 2015.<br>Genebank: Pathogen elimination of potato. CIP-OP017. v.19: |
| <b>CONTACT</b>                     | For most current version, please contact Brenda Zea (b.zea@cgiar.org)  |

- All fields marked with \* are required

## ENGLISH VERSION

## INTRODUCTION

---

Pathogen Elimination activity is fundamental to guarantee the conservation and safe exchange of germplasm.

Plant pathogens can be transmitted from diseased to healthy plants, but not all cells become infected; the meristematic tissues are highly probable to be pathogen free. It is possible to recover healthy plants by *in vitro* isolation, culture of meristem tips, and growing them into mature healthy plants (Lizarraga et al., 1991). By combining thermotherapy and meristem culture, is possible to obtain higher rates of virus-free material (Mori, 1971; Golmirzaie and Panta, 1997).

The process currently used is based on: a) Initial health status testing by serological, molecular and host range; b) Accessions with viral infection are subjected to virus elimination therapy by combining incubation at high temperature (Thermotherapy) with cut and meristem culture and c) Final health status testing to detect a possible virus infection remaining after virus elimination therapy.

## SCOPE

---

This protocol describes the procedure of the therapies used to eliminate virus of potato *in vitro* germplasm.

## SAFETY

---

Staff must:

- Wear a clean lab coat during all activities in the lab.
- Use security gloves to take objects out of the AUTOKEY.
- Wear safety glasses (or glasses) and mask when working in the laminar flow chamber.
- Know the following operational procedures:
  - Preparation of Culture Media - RD008
  - Good practices during *in vitro* bank activities -RD017
  - CIP's Health & Safety Manual

# MATERIALS

| <b>Equipment</b>                              |  |
|---|--|
| Autoclave                                     | Medium dispenser                             |
| PHmeter                                       | Analytical balance                           |
| Laminar flow chamber                          | Shakers                                      |
| Refrigerator                                  | Cultivation growth chamber                   |
| Stereoscope                                   | Microwave oven                               |
| Glass bead sterilizer                         | Enviromental monitoring device (HOBO logger) |
|   | Thermal printer for bar-code labelling       |
| <b>Other materials</b>                        |  |
| Test tubes<br>(13x100mm, 16x125mm, 25x150 mm) | Cotton                                       |
| Petri dishes                                  | Alcohol (96%)                                |
| Forceps                                       | Alcohol Burner                               |
| Scalpel blades N°10 and 11                    | Test tube caps                               |
| Saran wrap or Parafilm                        | Sterile tool holder                          |
| Handle scalpel                                | Labels                                       |
| Mask  | Gloves                                       |
| Sterile paper sheets                          | Laboratory coat                              |
| Culture media: MSA,MMP,NB                     |  |
|   |  |
|   |  |

# PROCEDURE

## 1. Material

1.1. The starting material can come from *in vitro* plantlets from CIP genebank, *in vitro* plantlets outside CIP, and/or tubers or cuttings.

1.2. Plants external to CIP must go through a quarantine period designated by SENASA (National Services of Agrarian Health) test prior to initial health diagnosis.

1.3. Tubers and/ or cuttings should be planted in pots under greenhouse conditions by Health Quarantine Unit (HQU), and two months after, proceed with *in vitro* introduction (see OP 055)

## 2. Initial health status testing

2.1. Request material from *in vitro* Genebank. Request 01 tube per accession to be tested.

2.2. Take a single plant for each material to evaluation which will be called mother plant and multiply to 3 test tubes of 16x125mm containing previously sterilized propagation medium (MSA). For details about medium preparation (see RD008).

2.3. Cut apical segment from the mother plant and placed in the first test tube containing MSA propagation medium, this tube will be sent for greenhouse for to start the Host Range test ( OP 070 ) and ELISA *in vivo* ( OP 019 ) using plants grown in the greenhouse (Test A).

2.4. Cut nodal segments with 1-2 buds and place two segments in the first and second test tube containing MSA propagation medium.

2.5. After 4-5 weeks of culture, take a tube and multiply to 3 test tubes containing 16 x 125mm MSA propagation medium. The first tube will be used for NASH test ( OP 020 ) and the second tube will be used for ELISA *in vitro* test ( OP 019 ) (Test B). The third tube in addition to the remaining tube obtained in step 2.4 will be kept as reserve stock in the area of virus elimination, to obtain the results of the tests.

2.6. After about five months, HQU reports the results of test A and B through CIPVIR (CIP- Virology Lab Managment System).

2.7. If the accession is negative to Test A and B, take a tube of reserve stock and multiply to 3 test tubes of 16x125mm containing propagation medium MSA, and perform to bacterial detection test (NB Test) (see Table 2).

## 3. Bacterial detection test (NB test)

3.1. Under sterile conditions, remove the plantlet from the tube above a sterile petri dish, cut the leaves and roots and cut the stem in 2-3 nodal segments.

3.2. Transfer the isolated explants to 3 test tubes of 16 x 125 mm containing MSA medium (Table 2), placing three explants per tube. For details about medium preparation (see RD008).

3.3. Finely cut residual material obtained in 3.1 to get a hash of leaves, stems and roots.

3.4. Insert this hash of residual material and an aliquot of culture medium inside the 16 x 125 mm test tube, containing 2 ml of NB medium (see Table 2).

3.5. Include a test tube as a positive control containing an accession sample with bacteria and a test tube as a negative control containing only NB medium.

3.6. Incubate the tubes containing the samples in NB medium at 23-25 °C for 3-5 days, then at 28 °C for 3-5 days. Evaluate the tubes on the 3rd and 6th day observing bacterial contaminants. The negative samples should continue to culture at 23-25 °C for a period of three weeks more. Then re-evaluate the tubes.

3.8. The accessions that are positive for bacteria detection test (NB medium in the presence of turbidity, precipitated and / or signs of bacterial growth), shall be submitted to the process of bacteria elimination (see OP 52).

3.9. The samples that are Negative (NB medium translucent) will be sent to bacteriology for a second bacterial detection (NA Test: Seeding Kelman and Nutrient Agar).

3.10. Accessions with negative results to the NB test will be declared as HS2 (see Table 1).

#### **4. Transfer of negative material to the Bank *in vitro***

4.1. Upload automatically results from database CIPVIR to database CIPTCL using cleaning platform "Diagnosis of result", and manually update only the results of the test for bacterial NB and NA.

4.2. Visually evaluate the rooting and growing process of the plantlets Before transferring the negative material.

4.3. After 4-5 weeks, transfer 2 tubes to *in vitro* Genebank, and 2 tubes must be conserving as a backup in the area of virus elimination, until the HS2 accession is completely established in the *in vitro* Genebank.

4.4. On delivery date to Genebank submit a report called "Transfer report of virus free plants"(Link), the same day a visual viability check of the plant material is performed and check each of de items the Check List (Link).

4.5. If the accession is positive to Test B and/or A, will proceed to multiply the material to initiate virus elimination therapies (see section 5).

#### **5. Virus elimination: Thermotherapy, meristem isolation and culture**

5.1. Multiply the stock HS0 plantlet infected with virus, to 3 test tubes of 25x150 mm containing MSA medium, placing 4 explants per test tube. For details about medium preparation (see RD008).

5.2. In vitro plantlets of 3-4 weeks old were submitted to thermotherapy at 32-34 °C during 3-4 weeks.

5.3. Six meristems 0.1-0.3 mm in length, comprising meristematic dome plus one or two leaf primordia are cut using a scalpel handle with sheets (No. 11). Exceptionally, only 4 meristems are cut (low stock or viability of mother plants).

|   |
|---|
| 5.4. Place meristems in test tubes of 13x100 containing MMP medium (see Table 2), insert 01 meristem per test tube.   |
| 5.5. Transfer meristems to fresh MMP culture medium every 7, 14, 21,38, 35,y 42 days and then every 15 days until obtained a rooted plantlet with at least 3 nodes. (Approximately after 2-3 months). For details about medium preparation (see RD008). |
| 5.6. Upload database CIPTCL such as: date of thermotherapy, meristem date, stock lines and meristems.   |
| <b>6. Final health status testing</b>   |
| 6.1 After obtaining plantlets from meristem culture, select the clone with better growth and development and 3 tubes multiply following the steps described in section 2.   |
| 6.2. Repeat virus indexing (Test A and B) for detecting a remaining potential viral infection.  |
| 6.3. If the accession is negative, repeat the bacterial detection test (point 3) and transfer of negative material to the bank <i>in vitro</i> (point 4).   |
| 6.4. If the first selected clone positive Test A and/or B, select a second and if required a third clone then repeat the process of virus indexing (Test A and B).  |
| 6.5. If 3 of the 6 clones are positive to the test A and/or B, the accession must pass again for the virus elimination process (thermotherapy and meristem culture) starting from the original plant <i>in vitro</i> stored in bank.                    |

**Table 1. List of potato viruses for indexing clones as HS1 or HS2**

| Crop   | HS1 Category*   | HS2 Category*   |
|--------|---|---|
| Potato | Genotypes tested negatives by NASH to PSVd, PVT; and ELISA using <i>in vitro</i> plantlets and plants grown in the greenhouse samples for most economically important virus such as: PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV y AVB-O. | Genotypes free from all reported potato virus, viroids and phytoplasmas. The diagnosis is made by the combination of: observation symptomatology, ELISA using <i>in vitro</i> plantlets and plants grown in the greenhouse samples, NASH and Host Range test and graft on D. Stramonium **. |

\* These materials should not show symptoms or signs of bacterial or fungal pathogens, \*\* The graft on D. Stramonium not accredited process but is done to complement the phytosanitary results.

**Name of virus and viroid (\*)**

PVX: Potato virus X; PVY: Potato virus Y; PLRV: Potato Leafroll virus; PVS: Potato virus S; APMoV: Andean Potato Mottle virus; APLV: Andean Potato Latent virus; PYV: Potato Yellowing virus; AVB-O: Arracacha virus B-oca strain; PVT: Potato Virus T and PSTVd: Potato spindle tuber viroid.

**Table 2. Multiplication (MSA) and Meristem media (MMP) composition for potato *in vitro* culture**

| Components | MMP | MSA |
|------------|-----|-----|
|------------|-----|-----|



|                         |      |      |
|-------------------------|------|------|
| MS salt (g/l) *         | 4.33 | 4.33 |
| Gibberellic acid (mg/l) | -    | 0.1  |
| Glycine-HCl (mg/l)      | 2.0  | 2.0  |
| myo-inositol (mg/l)     | 100  | 100  |
| Nicotinic acid (mg/l)   | 0.5  | 0.5  |
| Pyridoxine-HCl (mg/l)   | 0.5  | 0.5  |
| Thiamine-HCl (mg/l)     | 0.1  | 0.1  |
| Sucrose (g/l)           | 25   | 25   |
| Coconut milk (ml/l)     | 20   | -    |
| Phytigel (g/l)          | 3    |      |
| Agar (g/l)              | -    | 6    |
| pH                      | 5.6  | 5.6  |

\* Murashige y Skoog basal salts (1962) ; (Provider: Caisson)

**Table 3. Nutritive broth composition for detection of bacterial contaminants (NB).**

| Components            | NB |
|-----------------------|----|
| Peptone (g/l)         | 5  |
| Beef extract (g/l)    | 1  |
| Calcium nitrate (g/l) | 2  |
| Glucose (g/l )        | 10 |
| Sodium chloride (g/l) | 5  |
| pH                    | 7  |

## INTERNAL QUALITY CONTROL

1. Before starting to prepare culture media, verify that all reagents have not expired
2. Test tubes are identified with barcode labels.
3. Racks containing the in vitro materials are identified with barcode labels.
4. Bacteria testing to verify that the in vitro cultures are free of bacteria.
5. Monitoring of environmental conditions (temperature, relative humidity) using dataloggers (HOBOS).
6. Automatic transfer of results from CIPVIR database to CIPCL database.

## REFERENCES

---

- Mori, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. Japan Agric. Res. Quart 6, 1-7.
- Lizarraga, R., Panta, A., Espinoza, N. and Dodds, J.H. 1992. Tissue culture of *Ipomea batatas*: micropropagation and maintenance. CIP Research Guide 32 CIP, Lima, Peru.
- Golmirzaie, A. and Panta, A. 1997. Tissue culture methods and approaches for conservation of root and tuber crops. In: Razdan, M.K. and Cocking, E.C. Eds. Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro* Volume I: General Aspects. pp 123-152.

## VERSION EN ESPAÑOL

---

## INTRODUCCIÓN

---

La eliminación de patógenos es una actividad fundamental para garantizar la conservación y el intercambio seguro de germoplasma.

Los patógenos pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas, pero no todas las células son infectadas; los tejidos meristemáticos tienen posibilidades muy altas de encontrarse libres de patógenos. Es posible obtener plantas no infectadas mediante el aislamiento y cultivo de ápices meristemáticos, (Lizárraga et al., 1992), pero mediante la combinación de termoterapia y cultivo de meristemas, es posible obtener tasas más altas de material libre de virus (Mori, 1971; Golmirzaie y Panta, 1997).

El proceso actualmente utilizado consiste en: a) Realizar una prueba inicial de estado sanitario mediante pruebas serológicas, moleculares y prueba de rangos de huéspedes; b) Las accesiones encontradas con una infección viral se someten a la terapia de eliminación de virus que combina la incubación a elevadas temperaturas (Termoterapia) con el corte y cultivo de meristemas y c) Realizar una prueba final de estado sanitario para detectar una posible infección viral remanente después de la terapia de eliminación de virus.

## ALCANCE

---

Este protocolo describe el procedimiento de las terapias utilizadas para la eliminación de virus de germoplasma *in vitro* de papa.

## SEGURIDAD

---

- El personal debe vestir un mandil de laboratorio limpio en todas las actividades del laboratorio *in vitro*.
- Utilizar guantes de seguridad, al retirar material del autoclave.
- Utilizar lentes de seguridad (o lentes) y mascarilla durante el trabajo en el cámara de flujo laminar.
- El personal debe conocer los siguientes procedimientos operacionales:
  - Preparación de Medios de Cultivo - RD008
  - Buenas prácticas en las actividades del banco *in vitro*.
  - Manual de Salud y Seguridad

# MATERIALES

| <b>Equipos</b>  |   |
|---|---|
| Autoclave   | Dispensador de medio                                  |
| pHmetro   | Balanza analítica                                     |
| Cámara de Flujo Laminar                                     | Agitador magnético                                    |
| Refrigerador  | Cámara de crecimiento de cultivos                     |
| Esteroscopio  | Horno Microondas                                      |
| Esterilizador de perlas de vidrio                           | Dispositivo de monitoreo ambiental (HOBO)             |
|   | Impresora térmica (para etiquetas de código de barra) |
| <b>Otros materiales</b>                                     |   |
| Tubos de ensayo de vidrio<br>(13x100mm, 16x125mm, 25x150mm) | Algodón   |
| Placas Petri  | Alcohol (96%)   |
| Pinzas  | Mechero de alcohol                                    |
| Hojas de Bisturí #10 y #11                                  | Tapas plásticas para tubos de ensayo                  |
| Saran wrap o Parafilm                                       | SopORTE de herramientas estéril                       |
| Mango para bisturís   | Etiquetas   |
| Mascarilla  | Guantes   |
| Papel estéril   | Mandíl de laboratorio                                 |
| Medio de cultivo: MSA, MMP, NB                              |   |
|   |   |

# PROCEDIMIENTO

## 1. Material

1.1. El material inicial puede provenir de plántulas *in vitro* del banco de germoplasma del CIP, plántulas *in vitro* externas al CIP y/o tubérculos o esquejes.

1.2. Las plantas *in vitro* externas al CIP, deben pasar por un periodo de cuarentena designado por SENASA previo a la prueba de diagnóstico sanitaria inicial.

1.3. Tubérculos y/o esquejes, deben ser sembrados en macetas bajo condiciones de invernadero por la Unidad de Cuarentena Sanitaria (HQU), después de 2 meses, proceder con la introducción a *in vitro* (ver OP 055).

## 2. Prueba inicial del estado sanitario

2.1. Solicitar al Banco *in vitro*, 01 tubo por cada accesión que se desea evaluar.

2.2. Tomar una sola planta por cada accesión la cual será llamada planta madre y multiplicarla a 3 tubos de ensayo de 16 x 125mm que contienen medio de propagación MSA previamente esterilizado. Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).

2.3. Cortar el segmento apical de la planta madre y colocarlo en el primer tubo de ensayo conteniendo medio de propagación MSA, este tubo será enviado al invernadero para iniciar la prueba de Rango de Hospederos (OP 070) y para la prueba de ELISA (OP 019) utilizando muestras de plantas crecidas en el invernadero (Prueba A).

2.4. Cortar segmentos nodales con 1-2 yemas y colocar dos segmentos en el segundo y tercer tubo de ensayo conteniendo medio de propagación MSA.

2.5. Después de 4-5 semanas de cultivo, tomar el segundo tubo y multiplicarlo a 3 tubos de ensayo de 16 x 125mm que contienen medio de propagación MSA, el primero será utilizado para la prueba de NASH (OP 020) y el segundo para la prueba de ELISA *in vitro* (OP 019) (Prueba B), el tercer tubo junto al tubo restante obtenido en el punto 2.4 serán conservados como stock de reserva en el área de eliminación de virus, hasta obtener los resultados de las pruebas.

2.6. Después de aproximadamente 5 meses, HQU notificara los resultados de la prueba A y B a través del CIPVIR y también nos hará llegar un reporte conteniendo los resultados consolidados de todas las pruebas para cada una de las accesiones evaluadas (ver modelo de reporte).

2.7. Si la accesión resulta negativa a la Prueba A y B, tomar un tubo del stock de reserva y multiplicarlo a 3 tubos de 16 x 125 mm que contienen medio de propagación MSA, y realizar la prueba de detección bacteriana (prueba NB) (ver Tabla 2).

## 3.-Prueba de detección bacteriana (Prueba NB).

3.1. Retirar las plántulas bajo condiciones estériles y colocarlas en una placa Petri o papel estéril, remover las hojas, raíces y cortar el tallo en segmentos conteniendo de 2-3 nudos.

3.2. Transferir los segmentos aislados (2-3 nudos) a 3 tubos de ensayo conteniendo medio de propagación MSA, colocar tres segmentos por tubo. Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).

3.3. Cortar el material residual finamente obtenido en el punto 3.1, hasta obtener un picadillo de hojas, tallos y raíces de la plántula.

3.4. Colocar el picadillo del material residual y una pequeña porción de medio de cultivo dentro de los tubos de ensayo de 16 x 125 mm conteniendo 2 ml de medio NB (ver Tabla 2).

3.5. Incluir un tubo de ensayo como control positivo conteniendo muestras de una accesión con bacteria y un tubo de ensayo como control negativo conteniendo solo medio NB.

3.6. Incubar los tubos conteniendo las muestras en medio NB a 18-22°C durante 3-5 días, luego a 28°C durante 3-5 días.

3.7. Después de 6-7 días, evaluar los tubos conteniendo el medio NB, las muestras negativas (Medio NB translucido) deberán seguir un cultivo adicional por un periodo adicional de 3 semanas a 18-22°C, al finalizar las 4 semanas repetir la evaluación.

3.8. Las accesiones que resulten positivas a la prueba de detección de bacteria (medio NB con presencia de turbidez, precipitado y/o signos de crecimiento bacteriano), serán sometidas al proceso de eliminación de bacterias (ver OP 52).

3.9. Las muestras que resulten Negativas (medio NB translucido), serán enviadas a bacteriología para realizar una segunda detección bacteriana (Prueba NA: Siembra en Agar Kelman y Agar Nutritivo).

3.10. Las accesiones que resulten Negativas a la prueba NB serán declaradas como HS2 y serán transferidas al banco *in vitro* (ver Tabla 1).

#### **4.- Transferencia del material Negativo al Banco *in vitro***

4.1. Cargar de manera automática los resultados desde la base de datos CIPVIR a la base de datos CIPTCL de limpieza utilizando la plataforma de "Diagnostico de resultado", y actualizar solo de manera manual los resultados de la prueba de detección bacteriana NB y NA.

4.2. Evaluar visualmente el proceso de enraizamiento y crecimiento de las plántulas antes de proceder con la transferencia del material negativo.

4.3. Después de 4-5 semanas transferir 2 tubos al Banco *in vitro* y 2 tubos serán conservados como stock de reserva en el área de eliminación de virus, hasta el establecimiento total de las accesiones HS2 en el Banco *in vitro*.

4.4. El día de la transferencia al banco *in vitro* se entrega un reporte denominado "Reporte de transferencia de material libre de virus" (Link), el mismo día se debe realizar un chequeo visual de la viabilidad de las plántulas y revisar cada uno de los puntos descritos en el check list (Link).

4.5. Si la accesión resulta positiva a la Prueba B y/o la prueba A, se procederá a multiplicar el material para iniciar las terapias de Eliminación de virus (ver punto 5).

### 5. Eliminación de virus: Termoterapia, aislamiento y cultivo de meristemas.

5.1. Multiplicar el stock HS0 de la plántula infectada con virus, a 3 tubos de ensayo de 25x150 mm conteniendo medio MSA, colocar 4 explantes en cada tubo de ensayo. Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).

5.2. Las plántulas *in vitro* de 3-4 semanas de edad son sometidas a termoterapia a 32-34°C, durante 3-4 semanas

5.3. Seis meristemas de 0.2-0.3 mm de longitud, que comprende la cúpula meristemática mas uno a dos primordios foliares, son excisados usando un mango de bisturí con hojas (No. 11) En casos excepcionales, se corta solamente 4 meristemas por accesión (stock o viabilidad baja de plantas madres).

5.4. Colocar los meristemas en tubos de ensayo de 13x100 mm conteniendo medio para meristemas de papa MMP (Tabla 2), colocar un meristema por tubo.

5.5. Después de la excisión transferir los meristemas a un medio fresco de MMP cada 7, 14, 21, 28, 35 y 42 y finalmente cada 15 días hasta obtener una plántula enraizada con al menos tres nudos. (Aproximadamente después de 2-3 meses). Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).

5.6. Registrar en la base de datos CIPTCL datos como por ejemplo: fecha de termoterapia, fecha de corte de meristemas, stock de meristemas y stock de líneas.

### 6.- Prueba final del estado sanitario

6.1. Después de obtener plántulas del cultivo de meristemas, seleccionar el clon con mejor desarrollo de crecimiento y multiplicar a 3 tubos siguiendo los pasos descritos en el punto 2.

6.2. Repetir el indexado de virus (Prueba A y B) para detectar una posible infección viral remanente.

6.3. Si la accesión resulta negativa (Prueba A y B), realizar la prueba de detección bacteriana (punto 3) y transferir el material negativo al Banco *in vitro* (punto 4).

6.4. Si el primer clon seleccionado resulta positivo a la prueba A y/o B, seleccionar un segundo y si se requiere un tercer clon luego repetir el proceso de indexado de virus (Prueba A y B).

6.5. Si 3 de los 6 clones resultan positivos a la prueba A y/o B, la accesión deberán pasar nuevamente por el proceso de eliminación de virus (termoterapia y cultivo de meristemas) partiendo de la planta original conservada en el banco *in vitro*.

**Tabla 1. Categorización de estado sanitario.**

| Cultivo | Categoría HS1 * | Categoría HS2 * |
|---------|-----------------|-----------------|
| Potato  |                 |                 |

|   |  |
|---|--|
| <p>Genotipos probados negativos por NASH para PSTVd, PVT y ELISA utilizando muestras de plántulas <i>in vitro</i> y muestras de plantas crecidas en el invernadero para los virus económicamente más importantes tales como: PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV y AVB-O.</p> | <p>Genotipos libres de todos los virus de papa reportados, viroides y fitoplasmas. El diagnóstico es hecho por la combinación de: observación sintomatológica, ELISA utilizando muestras de plántulas <i>in vitro</i> y muestras de plantas crecidas en el invernadero, prueba de NASH, prueba de Rango de hospederos e injerto en D. Stramonium **.</p> |
|---|--|

\* Estos materiales no deberían mostrar síntomas o signos de bacterias o patógenos fúngicos / \*\* El injerto en D. Stramonium proceso no acreditado realizado para complementar los resultados fitosanitarios.

**Nombre de virus y viroide (\*)**

PVX: Potato virus X; PVY: Potato virus Y; PLRV: Potato Leafroll virus; PVS: Potato virus S; APMoV: Anden Potato Mottle virus; APLV: Anden Potato Latent virus; PYV: Potato Yellowing virus; AVB-O: Arracacha virus B-oca strain; PVT: Potato Virus T and PSTVd: Potato spindle tuber viroid.

**Tabla 2. Composición del medio de propagación (MSA) y meristemos (MMP) para cultivo *in vitro* de papa.**

| Componentes             | MMP  | MSA  |
|-------------------------|------|------|
| Sales MS(g/l) *         | 4.33 | 4.33 |
| Acido giberélico (mg/l) | -    | 0.1  |
| Glycina-HCl (mg/l)      | 2.0  | 2.0  |
| myo-inositol (mg/l)     | 100  | 100  |
| Acido nicotínico (mg/l) | 0.5  | 0.5  |
| Pyridoxina-HCl (mg/l)   | 0.5  | 0.5  |
| Thiamina-HCl (mg/l)     | 0.1  | 0.1  |
| Sacarosa (g/l)          | 25   | 25   |
| Agua de coco (ml/l)     | 20   | -    |
| Fitagel (g/l)           | 3    | -    |
| Agar (g/l)              | -    | 6.5  |
| pH                      | 5.6  | 5.6  |

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

**Tabla 3. Composición del medio de cultivo para detección de contaminantes bacterianos (NB).**

| Componentes | NB |
|-------------|----|
|-------------|----|



|                            |    |
|----------------------------|----|
| 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  |

## INTERNAL QUALITY CONTROL

1. Antes de comenzar a preparar los medios de cultivo, debe verificarse que los reactivos no estén vencidos (ver fecha de caducidad).
2. Los tubos de ensayo estén identificados con etiquetas con código de barras.
3. Las gradillas que contienen los materiales in vitro estén identificadas con código de barras.
4. Prueba de detección de bacterias para verificar que los cultivos in vitro estén libres de bacterias.
5. Monitoreo de condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa) utilizando dispositivos de almacenamiento de datos (HOBO).
6. Transferencia automática de resultados desde la base de datos CIPVIR a la base de datos CIPCL.

## REFERENCIAS

- Mori, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. Japan Agric. Res. Quart 6, 1-7.
- Lizarraga, R., Panta, A., Espinoza, N. and Dodds, J.H. 1992. Tissue culture of *Ipomea batatas*: micropropagation and maintenance. CIP Research Guide 32 CIP, Lima, Peru.
- Golmirzaie, A. and Panta, A. 1997. Tissue culture methods and approaches for conservation of root and tuber crops. In: Razdan, M. K. and Cocking, E.C. Eds. Conservation of Plant Genetic Resources\_ In Vitro\_ Volume I: General Aspects. pp 123-152.