

Genebank - Pathogen elimination of sweetpotato - OP018

Table of Contents

ENGLISH VERSION	4
INTRODUCTION	4
SCOPE	4
SAFETY	4
MATERIALS	5
PROCEDURE	6
VERSION EN ESPAÑOL	11
INTRODUCCION	11
SEGURIDAD	11
MATERIALES	12
PROCEDIMIENTO	13
REFERENCIAS	17

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

TITLE	Genebank - Pathogen elimination of sweetpotato - OP018
OWNER *	Phytosanitary Specialist
APPROVER *	Head Genebank
APPROVAL DATE *	September 17th, 2012
LAST REVIEW DATE *	September 5th, 2016
REVIEW FRECUENCY *	12 Months
ISSUE DATE	Apr 05, 2017 08:41
CONTRIBUTORS *	Zea, Brenda (CIP), Panta, Ana (CIP)
CITATION *	018
KEYWORDS	procedure, accredited, head_genebank
DOCUMENT ID *	OP018
VERSION NUMBER	v.15
COMPETENT PERSONNEL *	B.Zea;C.Llanos;M. Valverde; M.Ruiz;A.Ynga
RELATED CLAUSES	5.8
RELATED DOCUMENTS	RD025: RD008; RD017
CITATION OF THIS DOCUMENT *	Zea,B.; Ruiz,M.; Llanos,C.; Valverde,M.; Ynga,A.; Panta,A.; Barkley,N.A.; Ellis,D. 2015. Genebank: Pathogen elimination of sweetpotato. CIP-OP018. v.15:
CONTACT	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 pathogen free. It is possible to recover non-infected plants by *in vitro* isolation and culture of meristem tips, and growing them into mature healthy plants (Lizarraga et al., 1991), but 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 grafting in *Ipomoea setosa* for sweetpotato indexing; b) Accessions found which 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 therapy by virus elimination.

SCOPE

This protocol describes the procedure of the therapies used to virus elimination of sweetpotato *in vitro* germplasm.

SAFETY

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

MATERIALS

Equipment	
Autoclave	Dispenser pump
pH-meter	Analytical balance
Laminar flow chamber	Magnetic stirrer
Refrigerator	Grow chamber
Sterilizing oven	Microwave oven
Stereoscope	Environmental monitoring device (Datalogger (HOBO))
Glass bead sterilizer	Thermal printer (for barcode labels)
Other materials	
Test tubes (13x100mm, 16x 125mm, 18x150mm, 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: MPB, MMBI, MMBII ,NB	
Safety glasses	

PROCEDURE

1. Material

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

1.2. External plants to the CIP, must go through a quarantine period designated by SENASA test prior to initial health diagnosis.

1.3. Roots and/ or cuttings should be planted in pots under greenhouse conditions by Health Quarantine Unit (HQU), two months after, proceed with *in vitro* introduction (see OP 058).

2. Initial health status testing

2.1. Request the *in vitro* Genebank, 01 tube per accession to be tested.

2.2. Taking a single plant for each material to evaluation which will be called mother plant and multiply to 3 test tubes of 18 x 150mm containing propagation medium (MPB) previously sterilized. For details about medium preparation (see RD008).

2.3. Cut nodal segments with 1-2 buds and place two segments in each of the two tubes of 18 x 150 mm containing MPB culture medium. These two tubes will be kept as reserve stock for 4-5 weeks in the area of virus elimination.

2.4. Place an explant containing the bud in the third tube, the tube will be used for indexing of viruses (see OP 023) including NCM ELISA test (see OP 021), Begomovirus PCR detection and screening symptoms using I. Setosa as indicator plant (see OP 022) (test A).

2.5. After 4-5 weeks of culture, have a reserve stock tube (4.1) and multiply to 3 tubes of 18 x 150 mm containing MPB medium, these tubes will be kept as a reserve new stock in the area virus elimination, pending the results of the test A.

2.6. After about five months, HQU report the results through CIPVIR.

2.7. If the accession is negative to Test A, multiply the reserve stock in the area conserved virus elimination to 6 tubes 18 x 150 mm, and testing NB bacterial detection (see Table 2).

3. Bacterial Detection Test (NB Tested)

3.1. Under sterile conditions put out the plantlet above a sterile petri dish, cut the leaves and roots and cut the stem in 2-3 node segments.

3.2. Transfer the isolated explants to 6 test tubes of 18 x 150 mm containing MPB medium (Table 2), placing two explants per tube. For details about medium preparation (see RD008).

3.3. Cut finely residual material obtained in 3.1 until get a hash of leaves, stems and roots

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

3.5. Include a test tube as a positive control containing an accession samples 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 27-28 °C for 3-5 days. Evaluate the tubes to the 3rd and 6th day observing bacterial contaminants, the negative samples should continue to further culture at 23-25° C for a period of three weeks, then re-evaluate the tubes.

3.7. After 6 days, evaluate the tubes containing NB medium, the negative samples (NB medium translucent) should follow further cultivation for a period of 3 weeks at 23-25° C, at the end of 4 weeks repeat the evaluation.

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 53).

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

3.10. Negative Accessions to the test result 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 5-6 weeks, transfer 2 tubes to *in vitro* genebank, 2 tubes will be sent to Huancayo as safety duplicate and 2 tubes must be conserve as a backup in the area of virus elimination, to the full establishment HS2 accessions 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 A, will proceed to multiply the material to initiate virus removal therapies.

5. Virus elimination: Thermotherapy, isolation and meristem culture

5.1. Multiply the stock HS0 plantlet infected with virus, to 4 test tubes of 25x150 mm containing MPB medium, placing 2 explants per test tube. For details about medium preparation (see RD008).

5.2. In vitro plantlets of 15-21 days old were submitted to thermotherapy at 35-37 °C during 3-4 weeks.

5.3. Six meristems 0.25-0.35 mm in length, comprising meristematic dome plus one to two leaf primordia are cut using a scalpel handle with sheets (No. 11).
5.4. Place meristems in test tubes of 13x100 containing MMBI medium (see Table 2), insert 01 meristem per test tube.
5.5. Transfer meristems to fresh MMBI culture medium every 3, 6 and 9 days, then transfer every 7, 14, 21 days fresh MMBII medium (see Table 2) and then every 15 days until obtained a rooted plantlet with at least 3 nodes. (Approximately after 3-4 months). For details about medium preparation (see RD008).
5.6. Upload CIPTCL database example: date of thermotherapy, meristem date, stock lines and meristems.
6. Final health status testing
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) 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, select a second and if required a third clone then repeat the process of virus indexing (Test A).
6.5.If 3 of the 6 clones are positive to the test A, the accession must pass again through the virus elimination therapy (thermotherapy and meristem culture).

Table 1. Categories of sweetpotato health status by virus tested.

Crop	HS1 Category*	HS2 Category*
Sweetpotato	Genotypes tested negatives by NCM-ELISA to viruses: SPFMV, SPLV, SPMMV, SPVG, SPMSV, SPCFV, C-6 virus, SPCSV, SPCaLV, an CMV.	Genotypes free from all reported sweetpotato viruses. The diagnostic is made by a combination of: symptomatology observation, NCM-ELISA and negative symptoms in the <i>I. setosa</i> graft.

* These materials should not show symptoms or signs of bacterial or fungi pathogens.

Nombre de virus (*)

SPFMV: *Sweetpotato feathery mottle virus*; SPLV: *Sweetpotato latent virus*; SPMMV: *Sweetpotato mild mottle virus*; SPVG: *Sweetpotato virus G*; SPMSV: *Sweetpotato mild speckling virus*; SPCFV: *Sweetpotato chlorotic fleck virus*; C-6 virus; SPCSV: *Sweetpotato chlorotic stunt virus*; SPCaLV: *Sweetpotato caulimolike virus*; and CMV: *Cucumber mosaic virus*.

Table 2. Multiplication (MPB) and meristem (MMB I, MMB II) media composition for *in vitro* culture of sweetpotato.

	MPB	MMB I	MMB II
MS salts (g/l)	4.3	4.3	4.3
Ascorbic acid (g/l)	0.2	0.1	0.1
Calcium nitrate (g/l)	0.1	0.1	0.1
Calcium panthotenate (mg/l)	2	2	2
Gibberellic acid (mg/l)	10	20	10
L-Arginine (g/l)	0.1	0.1	0.1
Putrescine-HCl (mg/l)	20	20	20
Sucrose (g/l)	30	30	30
Coconut milk (ml/l)	—	10	10
Agar (g/l)	—	6	6
Phytigel (g/l)	3	—	—
pH	5.7	5.7	5.7

Table 3. Nutritive broth composition for detection of bacterial contaminants.

	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 database CIPVIR to database CIPCL.

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

INTRODUCCION

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 e injerto en *Ipomoea setosa*; 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

ALCANCES

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

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 la 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

Equipos	
Autoclave	Dispensador de medio
pH-metro	Balanza analítica
Camara de flujo laminar	Agitadores magnéticos
Refrigerador	Cámara de crecimiento de cultivo
Horno esterilizador	Horno microondas
Estereoscopio	Dispositivo para monitoreo ambiental (HOBO)
Esterilizador de perlas de vidrio	Impresora térmica (para etiquetas de código de barra)
Otros materiales	
Tubos de ensayo de vidrio (13x100mm, 16x125mm, 18x150mm, 25x150mm)	Algodón
Placas petri	Alcohol (96%)
Pinzas	Mechero de alcohol (96%)
Hojas de bisturí #10 y 11	Tapas plásticas para tubos de ensayo
Saran wrap or Parafilm	Soporte de herramientas estéril
Mango para bisturís	Etiquetas
Mascarilla	Guantes
Papel estéril	Mandíl de laboratorio
Medio de cultivo: MPB, MMBI, MMBII, NB	
Lentes de seguridad	

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 de raíces 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. Raíces 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 058).

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 18 x 150mm que contienen medio de propagación MPB previamente esterilizado. Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (see RD008).

2.3. Cortar segmentos nodales con 1-2 yemas y colocar dos segmentos en cada uno de los dos tubos de 18 x 150mm conteniendo medio de cultivo MPB. Estos dos tubos serán conservados como stock de reserva, durante 4-5 semanas en el área de eliminación de virus.

2.4. Colocar un explante conteniendo la yema apical en el tercer tubo, este tubo será utilizado para el indexado de virus (ver OP 023) que incluye la prueba de NCM ELISA (ver OP 021), PCR para detección de Begomovirus, y detección de síntomas utilizando *I. Setosa* como planta indicadora (ver OP 022) (Prueba A).

2.5. Después de 4-5 semanas de cultivo, tomar un tubo del stock de reserva (punto 4.1) y multiplicarlo a 3 tubos de 18 x 150 mm conteniendo medio MPB, estos tubos serán conservados como un nuevo stock de reserva en el área de eliminación de virus, hasta obtener los resultados de la prueba A.

2.6. Después de aproximadamente 5 meses, HQU notificara los resultados 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, multiplicar el stock de reserva conservado en el área de eliminación de virus a 6 tubos de 18 x 150 mm, y realizar la prueba de detección bacteriana 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 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 6 tubos de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo medio de propagación (MPB), colocar dos 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 23-25°C durante 3-5 días, luego a 28°C durante 3-5 días.

3.7. Después de 6 días, evaluar los tubos conteniendo medio NB, las muestras negativas (Medio NB translucido) deberán seguir un cultivo adicional por un periodo de 3 semanas a 23-25°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 053).

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 NA serán declaradas como HS2 (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 5-6 semanas transferir 2 tubos al Banco *in vitro*, 2 tubos serán enviados Huancayo como copia de seguridad 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 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 meristemos.

5.1. Multiplicar el stock HS0 de la plántula infectada con virus, a 4 tubos de ensayo de 25x150 mm conteniendo medio MPB, colocar 2 explantes por cada tubo de ensayo. Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).
5.2. Las plántulas <i>in vitro</i> de 15-21 días de edad son sometidas a termoterapia a 35-37°C, durante 3-4 semanas.
5.3. Seis meristemos de 0.25-0.35 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 solo 4 meristemos por accesión (stock o viabilidad baja de plantas madres)
5.4. Colocar los meristemos en tubos de ensayo de 13x100 mm conteniendo medio para meristemos de camote MMB1 (Tabla 2).
5.5. Después de la excisión transferir los meristemos a un medio fresco de MMB1 cada 3, 6 y 9 días, luego transferirlos cada 7, 14 ,21 días a un medio fresco de MMB2 (ver Tabla 2) y finalmente cada 15 días hasta obtener una plántula enraizada con al menos tres nudos. (Aproximadamente después de 3-4 meses). Para detalles sobre la preparación de medios de cultivo (ver RD008).
5.6. Registrar en la base de datos CIPTCL datos como: fecha de termoterapia, fecha de corte de meristemos, stock de meristemos y stock de líneas.
6.- Prueba final del estado sanitario
6.1. Después de obtener plántulas del cultivo de meristemos, 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) para detectar una posible infección viral remanente.
6.3. Si la accesión resulta negativa, realizar la prueba de detección bacteriana (punto 3) y transferir el material negativo al Banco <i>in vitro</i> (punto 4).
6.4. Si el primer clon seleccionado resulta positivo a la prueba A, seleccionar un segundo y si se requiere un tercer clon luego repetir el proceso de indexado de virus (Prueba A).
6.5. Si 3 de los 6 clones resultan positivos a las prueba A, la accesión deberán pasar nuevamente por la terapia de eliminación de virus (termoterapia y cultivo de meristemos).

Tabla 1. Categorización de estado sanitario.

Cultivo	Categoría HS1*	Categoría HS2*
Camote	Genotipos probados negativos por NCM-ELISA para los virus: SPFMV, SPLV, SPMMV, SPVG, SPMSV, SPCFV, virus C-6, SPCSV, SPCaLV, y CMV.	Genotipos libres de todos los virus de camote reportados. El diagnóstico es hecho por la combinación de observación sintomatológica, NCM-ELISA y síntomas negativos en los injertos de <i>I. setosa</i> .

* Estos materiales no deberían mostrar síntomas de bacteria o patógenos fungicos.

Virus name (*)

SPFMV: *Sweetpotato feathery mottle virus*; SPLV: *Sweetpotato latent virus*; SPMMV: *Sweetpotato mild mottle virus*; SPVG: *Sweetpotato virus G*; SPMSV: *Sweetpotato mild speckling virus*; SPCFV: *Sweetpotato chlorotic fleck virus*; C-6 virus; SPCSV: *Sweetpotato chlorotic stunt virus*; SPCaLV: *Sweetpotato caulimolike virus*; and CMV: *Cucumber mosaic virus*.

Tabla 2. Composición de los medios de multiplicación (MPB) y de meristemas (MMB I, MMB II) para el cultivo *in vitro* de camote.

Componentes	MPB	MMB I	MMB II
Sales MS (g/l)	4.3	4.3	4.3
Acido ascórbico (g/l)	0.2	0.1	0.1
Nitrato de calcio (g/l)	0.1	0.1	0.1
Pantotenato de calcio (mg/l)	2	2	2
Acido Giberélico (mg/l)	10	20	10
L-Arginina (g/l)	0.1	0.1	0.1
Putrescina-HCl (mg/l)	20	20	20
Sacarosa (g/l)	30	30	30
Agua de coco (ml/l)	—	10	10
Agar (g/l)	—	6	6
Phytigel (g/l)	3	—	—
pH	5.7	5.7	5.7

Table 3. Composición de medio de cultivo para detección de contaminantes bacterianos.

	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

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

1. Antes de comenzar a preparar los medios de cultivo, debe verificarse que los reactivos tienen su fecha de vencimiento vigente
2. Los tubos de ensayo son identificados con etiquetas con código de barras.
3. Las gradillas que contienen los materiales in vitro son 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.