


# Health status testing and virus elimination in potato - OP17

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>TITLE</b>           | Health status testing and virus elimination in potato - OP17                           |
| <b>OWNER</b>           | Head_IVU, B.Zea, G.Muller,R. Falcon C.Chuquillanqui                                    |
| <b>APPROVER</b>        | Head Genebank  |
| <b>APPROVAL DATE</b>   |  |
| <b>ISSUE DATE</b>      | Sep 10, 2010 11:42   |
| <b>CONTRIBUTORS</b>    |  |
| <b>CITATION</b>        |  |
| <b>KEYWORDS</b>        | procedure , accredited , head_ivu , head_genebank , b_zea , c_chuquillanqui , g_muller |
| <b>NEXT REVISION</b>   |  |
| <b>DOCUMENT ID</b>     | OP17   |
| <b>VERSION NUMBER</b>  | 88   |
| <b>SPANISH VERSION</b> |  |

| INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP   |                    |            |  |
|---|--------------------|------------|--|
|  |                    |            |  |
| Version   | Date               | Author     | Comment                                      |
| 88  | Sep 10, 2010 11:42 | Brenda Zea |  |
| 87  | Sep 10, 2010 11:41 | Brenda Zea |  |
| 86  | Sep 08, 2010 16:25 | Brenda Zea |  |
| 85  | Sep 08, 2010 13:32 | Brenda Zea |  |
| 84  | Sep 08, 2010 11:58 | Luis Rojas | Changed page structure for bilingual format. |

## INTRODUCTION

Virus elimination will be carried out on all materials maintained or generated at CIP prior to its distribution. A virus elimination technique has been developed on the basis of thermotherapy and meristem culture with an efficiency close to 100%.

Pathogen tested clones can be awarded different Health Status (HS):

HS1: clones negative to pathogens of quarantine importance and viruses detected by NASH (PSTVd & PVT) and ELISA tests; this material can be distributed only within Peru.

HS2: accessions negative to all pathogens reported up to date (detected by NASH, PCR ELISA and Host Range test); they can be distributed internationally.

## SCOPE

This procedure covers the health testing and virus elimination of potato germplasm maintained in the genebank or generated at CIP prior to its distribution.

## SAFETY

The personal should know the following protocols:

[Preparation of Cultivation Media - OP74](#)

[Good practices during in vitro bank activities](#)

## MATERIALS

| Equipment              |                            |
|------------------------|----------------------------|
| Autoclave              | Medium dispenser           |
| PHmeter                | Analytical balance         |
| Laminar flow chamber   | Shakers                    |
| Refrigerator           | Cultivation growth chamber |
| Oven                   | Microwave oven             |
| Stereoscope            |                            |
| Other materials        |                            |
| Glass test tube        | Cotton                     |
| Petri dishes           | Alcohol                    |
| Forceps                | Burner                     |
| Blades                 | Sterilizer                 |
| Saran wrap or Parafilm | Jiffy                      |
| Pots                   |                            |

## PROCEDURE

### Material

Starting material can come from *in vitro* plantlets from the CIP genebank, *in vitro* plantlets from outside CIP or from greenhouse/field tubers or cuttings.

*In vitro* plantlets from outside CIP must pass an incubation period of 7 days under quarantine conditions before its multiplication for initial health status testing.

Roots, tubers or cuttings must be planted in pots under quarantine conditions. Initial health status testing (NASH for PSTVd and PVT and ELISA for PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV and AVB-O ) must be carried out under ADU responsibility. If the material results infested with the viroid PSTVd, incinerate the material.

Introduce greenhouse/field material into *in vitro* according to the protocol "Introduction of Potato to *In Vitro* Culture" (OP55). Select a vigorous and bacteria-negative clone. This clone, mother plant, is grown from one explant containing one bud.

If the material came from *in vitro* plantlets from CIP genebank, culture one apical shoot tip for 5 weeks in a 16x125mm test tube with MSA media (Table 2). This plantlet is considered the mother plant.

### Initial health status testing

Multiply the mother plantlet into four test tubes:

- a) Place one explant containing the apical shoot of the mother plant in a 16x125mm test tube with MSA media. This tube will be conserved as stock HS0.
- b) Place 2-4 explants containing one bud in a 16x125mm test tube with MSA media. These tubes will be used for Test A (NASH test).
- c) Place 2-4 explants containing one bud in a 16x125mm test tube with MSA media. These tubes will be used for Test A (ELISA test).
- d) Place one explant containing one bud in a 16x125mm test tube with MSA media. This tube will be used for Test B (ELISA and Host range test).

### **Test A**

#### **NASH**

PSTVd and PVT are tested by NASH in collaboration with CIP Health Quarantine Unit (HQU).

- a) Select a tube containing 2-4 stems with leaves (~0.2 g) from 3-4 week old *in vitro* plantlets grown in MSA medium.
- b) Print a barcode label for each accession to be evaluated and stick onto a 4"x6"x6" plastic bag.
- c) Plantlets plus agar plug are taken out from the tube and placed on a petri dish. Using sterilized knife and forceps, stems are cut just above the roots and transferred into a plastic bag.
- d) Add 2 ml of 5xSSC extraction buffer (OP20) and macerate the sample by rolling a test tube over each plastic bag. Extraction buffer is provided by HQU.
- e) Transfer 0.5 ml to an Eppendorf tube and centrifuge at 14,000 rpm for 5 minutes.
- f) Dispense 5 ul of the supernatant from each sample on a nitrocellulose membrane by making circular movements. This membrane will be used to detect PVT. Membrane is provided by HQU.
- g) Add 0.5 ml from the lower phase of the phenol-chloroform solution to the remaining supernatant in the Eppendorf tube. Work under laboratory hood and wear thick gloves, special glasses and a mask.
- h) Mix well in a vortex.
- i) Centrifuge at 10,000 rpm for 5 minutes.
- j) Dispense 5 ul of the supernatant from each sample on a nitrocellulose membrane by making circular movements. This membrane will be used to detect PSTVd. Membrane is provided by HQU.
- k) Membranes are hybridized by HQU following the [Nucleic Acid Hybridisation detection of PSTVd and PVT - OP20](#).

#### **ELISA**

PVS, PVY, PVX, APLV, PLRV, APMoV, PYV, and AVB-O are tested by ELISA in collaboration with CIP Health Quarantine Unit (HQU).

- a) Select a tube containing 2-4 stems with leaves (~ 0.2 g) from 3-4 week old *in vitro* plantlets grown in MSA medium.
- b) Print a barcode label for each accession to be evaluated and stick onto a 4"x6"x6" plastic bag.
- c) Plantlets are taken from the tube using forceps and placed without roots in the plastic bag. Avoid direct contact with the part of the plant where the cut has been done.
- d) Add 4 ml of extraction buffer and macerate the sample by rolling a test tube over each plastic bag. Extraction buffer is provided by HQU.
- e) Fill the ELISA plate wells with 100 ul of the sample extract. Use a clean auto-pipette tip for each sample. The plate is loaded following the order by columns and a maximum of 90 samples can be tested per plate. ELISA plates previously coated with the specific antibody are provided by HQU. One ELISA plate is used for each virus to be evaluated.
- f) After loading all the samples, two wells are filled with extraction buffer further by positive and negative controls added in this order, to at least two wells. Controls are provided by HQU.
- g) Plates are sealed and sent to HQU.
- h) Plates are processed by HQU following the [DAS-ELISA detection of plant viruses - OP19](#).
- i) If the material results infected with the viroid PSTVd, incinerate the material.

Accessions that result positive to test A are submitted to the virus elimination protocol. Accessions that result negative or ambiguous suspect to test A are submitted to Test B.

### **Test B**

- a) One month-old *in vitro* plantlet is transferred to jiffy and grown under greenhouse conditions for 3-4 weeks and then transferred to soil in pot for growing 4-5 weeks more (OP70). At this stage the grown on plants are tested by DAS ELISA as indicated in OP-19.
- b) Remove 2-3 leaflets from the apical, medium and basal part of the plant, with a total weight of 1 g approx. Place the leaflets in a 4"x6"x6" plastic bag. The first three samplings are done under the supervision of HQU.
- c) Add 0.01M phosphate buffer (pH 8) in a proportion of 1:3 with the sample and macerate. Phosphate buffer is provided by HQU.
- d) The indexing is made using the following species: *Nicotina tabacum* "White Burley", *N. glutinosa*, *N. debneyii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovi* x *N. clevelandi*, *Chenopodium quinoa*, *C. murale*, *Datura stramonium* or *D. metel* *Gomphrena globosa* and *Lycopersicon esculentum* "rutgers" and following protocol OP70. The first three inoculations are done under the supervision of HQU.
- e) If the clone results negative to test A and B, multiply the stock and submit it to the bacteria detection test using nutritive media (NB) [5.0 g/l peptone, 1.0 g/l beef extract, 2.0 g/l yeast extract, 10.0 g/l glucose, and 5.0 g/l sodium chloride at pH 7.0] and nutrient agar (ND) supplemented with 1% D-glucose. Incubate the cultures at 32-34°C and 21°C respectively for 21 days. If the clone results negative, the accession is declared HS2 and is included in the *in vitro* genebank.
- f) Clones resulting positive to the bacteria detection test (cloudy medium) are submitted to the bacteria elimination process.
- g) Accessions that result positive to test B are submitted to the virus elimination protocol.

#### **Virus elimination: thermotherapy, meristem isolation and culture**

- a) Multiply the stock HS0 plantlet into four 25x150mm test tubes with MSA media, placing four explants in each test tube.
- b) 3-4 week old *in vitro* plantlets are submitted to thermotherapy at 32-34°C during 1 month.
- c) Six meristems of 0.1-0.3 mm long, comprising the meristematic dome plus one or two leaf primordia, are excised using a dissecting knife handle with a blade (No. 11) and cultivated in 13x100mm test tubes with potato meristem medium (Table 2).

d) Meristems are sub-cultivated at 3, 6, and 9 days after meristem excision, then every 7, 10 or 15 days, until a rooted plantlet with at least three nodes is obtained.

### Final diagnostic

- a) After plantlets are obtained from meristem culture, select the clone with better growth development and multiply into four tubes.
- b) Repeat health status testing, as above, to detect any remaining virus infection.
- c) If the clone resulted negative to test A and B, multiply the stock and submit it to the bacteria detection test using nutritive broth medium (NB) [5.0 g/l peptone, 1.0 g/l beef extract, 2.0 g/l yeast extract, 10.0 g/l glucose, and 5.0 g/l sodium chloride at pH 7.0]. Incubate the cultures for 48 h at 32-34°C and then for 3 weeks at 19-21°C. If the clone results negative, the accession is declared HS2 (see Table 1) and is included in the *in vitro* genebank. Identity verification must be conducted on these materials before their distribution.
- d) Clones resulting positive to the bacteria detection test (cloudy medium) are submitted to the bacteria elimination process (OP52).
- e) If the clone resulted positive to test A or B, select another clone and repeat health status testing.
- f) If the six clones resulted positive to test A or B, the accessions must enter the cleaning process again (thermotherapy and meristem culture).

**Crop HS1 Category** are those genotypes tested negative by serology (ELISA) to the most economically important viruses such as PLRV, PVY, PVX, PVS, APMoV, APLV, PYV and AVB-O; and tested negative by NASH to PSTVd and PVT.

**HS2 Category** genotypes are those free from all reported potato viruses, viroids and phytoplasmas. The diagnostic is made by a combination of symptomatology observation, ELISA serology, NASH test, and infectivity test in a selected range of virus indicator hosts.

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

| Crop   | HS1 Category*   | HS2 Category*  |
|--------|---|--|
| Potato | Genotypes tested negative by serology (ELISA) to the most economically important viruses including PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV, AVB-O; and tested negative by NASH to PSTVd and PVT | Genotypes free from all reported potato viruses, viroids and phytoplasmas. The diagnostic is made by a combination of: symptomatology observation, ELISA serology, NASH test, and infectivity test in a selected range of virus indicator hosts. |

\* These materials should not show symptoms or signs of bacterial or fungal pathogens

**Table 2.** Multiplication and Meristem media composition for potato *in vitro* culture

| Components              | Meristem medium (MMP) | Multiplication medium (MSA) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
|                         | Quantity              | Quantity                    |
| MS salt (g/L) *         | 4.33                  | 4.33                        |
| Gibberellic acid (mg/L) | 0.1                   | 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 and Skoog basal Salts (1962)

## INTRODUCCION

| La eliminación de virus será llevada a cabo en todos los materiales mantenidos o generados en el CIP antes de su distribución. Una técnica de eliminación de virus ha sido desarrollada en las bases de termoterapia y cultivo de meristemos con una eficiencia cercana al 100%.  
 HS1: clones negativos a patógenos de importancia cuarentenaria y virus detectados por pruebas de NASH (PSTVd & PVT) y ELISA; este material puede ser distribuido solamente dentro del Perú.  
 HS2: accesiones negativas a todos los patógenos reportados a la fecha (detectados por NASH, PCR ELISA y Prueba de Rango de Hospederos); éstos pueden ser distribuidos internacionalmente. |

## ALCANCE

| Este procedimiento cubre las pruebas de sanidad y eliminación de virus del germoplasma de papa mantenido en el banco de germoplasma o generado en el CIP antes de su distribución. |

## SEGURIDAD

|  
 El personal debe conocer los siguientes protocolos:

[Preparación de Medios de Cultivo - OP74](#)

[Buenas prácticas durante las actividades in vitro del banco](#)

|

## MATERIALES

|| Equipos ||

|                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Autoclave                 | Dispensador de medio              |
| pHmetro                   | Balanza analítica                 |
| Cámara de Flujo Laminar   | Agitadores                        |
| Refrigerador              | Cámara de crecimiento de cultivos |
| Horno                     | Horno Microondas                  |
| Estereocopio              |                                   |
| <b>Otros materiales</b>   |                                   |
| Tubos de ensayo de vidrio | Algodón                           |
| Placas Petri              | Alcohol                           |
| Pinzas                    | Mechero                           |
| Hojas de Bisturí          | Esterilizador                     |
| Saran wrap o Parafilm     | Jiffy                             |
| Macetas                   |                                   |

## PROCEDIMIENTO

### Material

El material de inicio puede provenir de plántulas in vitro del banco de germoplasma del CIP, plántulas in vitro externas al CIP o de invernadero/tubérculos o esquejes de campo. Las plántulas in vitro del exterior del CIP deberán pasar por un período de incubación de 7 días bajo condiciones de cuarentena antes de su multiplicación para las pruebas del estado sanitario inicial. Las raíces, tubérculos o esquejes deben ser sembrados en macetas bajo condiciones de cuarentena. Las pruebas iniciales de estado sanitario (NASH para PSTVd y PVT y ELISA para PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV y AVB-O ) deberán ser llevadas a cabo bajo la responsabilidad de ADU. Si el material resulta infectado con viroides PSTVd, incinerar el material. Introducir el material de invernadero/campo a *in vitro* de acuerdo al protocolo "Introducción de Papa a Cultivo *In Vitro*" (OP55). Seleccionar un clon vigoroso y negativo a presencia de bacteria. Este clon, planta madre, es cultivado a partir de

un explante conteniendo una yema. Si el material vino de plántulas *in vitro* del banco de germoplasma del CIP, cultivar un meristemo apical por 5 semanas en un tubo de ensayo de 16x125mm con un medio MSA (Tabla 2). Esta plántula es considerada la planta madre.

### Prueba inicial del estado de sanitario

Multiplicar la planta madre en 4 tubos de ensayo:

- a) Colocar un explante conteniendo la yema apical de la planta madre en un tubo de ensayo de 16x125mm con medio MSA. Este tubo será conservado como stock HS0.
- b) Colocar 2-4 explantes conteniendo una yema en un tubo de ensayo de 16x125mm con un medio MSA. Estos tubos serán usados para la Prueba A (Prueba de Nash).
- c) Colocar 2-4 explantes conteniendo una yema en un tubo de ensayo de 16x125mm con un medio MSA. Estos tubos serán usados para la Prueba A (Prueba de Elisa).
- d) Colocar un explante conteniendo una yema en un tubo de ensayo de 16x125mm con un medio MSA. Este tubo será usado para la Prueba B (ELISA y Prueba de Rango de Hospederos).

### Prueba A

#### NASH

PSTVd y PVT son analizados por NASH en colaboración con la Unidad de Cuarentena Sanitaria (HQU) del CIP.

- a) Seleccionar un tubo conteniendo 2-4 tallos con hojas (~0.2 g) de plántulas *in vitro* de 3-4 semanas cultivadas en un medio MSA.
- b) Imprimir una etiqueta con código de barras para cada accesión a ser evaluada y pegarla en una bolsa plástica de 4"x6"x6".
- c) Plántulas con restos de agar son sacadas del tubo y colocadas en una placa petri. Usando bisturí y pinzas, los tallos son cortados justo encima de las raíces y transferidos a una bolsa plástica.
- d) Añadir 2 ml de buffer de extracción 5xSSC (OP20) y macerar la muestra deslizando un tubo de ensayo sobre cada bolsa plástica. El buffer de extracción es proporcionado por HQU.
- e) Transferir 0.5 ml a un tubo Eppendorf y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
- f) Dispensar 5 µl del sobrenadante de cada muestra a una membrana de nitrocelulosa haciendo movimientos circulares. Esta membrana será usada para detectar PVT. La membrana es proporcionada por HQU.
- g) Añadir 0,5 ml de la fase inferior de la solución de fenol-cloroformo al sobrenadante restante en el tubo Eppendorf. Trabajar bajo una campana de laboratorio y usar guantes gruesos, lentes especiales y mascarilla.
- h) Mezclar bien usando un vortex.
- i) Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
- j) Dispensar 5 µl del sobrenadante de cada muestra en una membrana de nitrocelulosa haciendo movimientos circulares. Esta membrana será usada para detectar PSTVd. La membrana es proporcionada por HQU.
- k) Las membranas son hibridizadas por HQU siguiendo [Detección de hibridización de ácido nucleico para PSTVd y PVT - OP20](#).

#### ELISA

PVS, PVY, PVX, APLV, PLRV, APMoV, PYV, y AVB-O son analizados por ELISA en colaboración con la Unidad de Cuarentena Sanitaria (HQU) del CIP.

- a) Seleccionar un tubo conteniendo 2-4 tallos con hojas (~0.2 g) de plántulas *in vitro* de 3-4 semanas cultivadas en un medio MSA.
- b) Imprimir una etiqueta con código de barras para cada accesión a ser evaluada y pegarla en una bolsa plástica de 4"x6"x6".
- c) Las plántulas son sacadas del tubo usando pinzas y colocadas sin raíces en una bolsa plástica. Evitar el contacto directo con la parte de la planta donde el corte ha sido hecho.
- d) Añadir 4 ml de buffer de extracción y macerar la muestra girando un tubo de ensayo sobre cada bolsa plástica. El buffer de extracción es proporcionado por HQU.
- e) Llenar los pocillos de la placa de ELISA con 100 µl del extracto de la muestra. Usar puntas para micropipetas limpias para cada muestra. La placa es llenada siguiendo el orden por columnas y un máximo de 90 muestras por placa puede ser analizada. Las placas de ELISA previamente recubiertas con los anticuerpos específicos son proporcionadas por HQU. Una placa de ELISA es usada para cada virus a ser evaluado.
- f) Luego de llenar todas las muestras, 2 pocillos son llenados con buffer de extracción más controles positivo y negativo añadidos a este orden, al menos 2 pocillos. Los controles son proporcionados por HQU.
- g) Las placas son selladas y enviadas a HQU.
- h) Las placas son procesadas por HQU siguiendo [la detección DAS-ELISA de virus de plantas - OP19](#).
- i) Si el material resulta infectado con el viroide PSTVd, incinerar el material.

Las accesiones que resulten positivas a la Prueba A son sometidas al protocolo de eliminación de virus. Las accesiones que resulten negativas o sospechosas ambiguas a la Prueba A son sometidas a la prueba B.

### Test B

- a) Una plántula *in vitro* de un mes de edad es transferida a jiffy y cultivada bajo condiciones de invernadero por 3-4 semanas y luego transferidas a suelo en macetas para cultivarlas de 4 a 5 semanas más (OP70). En esta etapa el crecimiento de las plantas es probado por DAS ELISA de acuerdo a lo indicado en OP-19.
- b) Remover 2-3 hojas de las partes apical, media y basal de la planta, con un peso total de 1 g aproximadamente. Colocar las hojuelas en una bolsa plástica de 4"x6"x6". Los primeros 3 muestreos son hechos bajo la supervisión de HQU.
- c) Añadir buffer fosfato 0.01 M (pH 8) en una proporción de 1:3 con la muestra y macerar. El buffer fosfato es proporcionado por HQU.
- d) El indexado es hecho usando las siguientes especies: *Nicotina tabacum* "White Burley", *N. glutinosa*, *N. debneyii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovi* x *N. clevelandi*, *Chenopodium quinoa*, *C. murale*, *Datura stramonium* o *D. metel*, *Gomphrena globosa* y *Lycopersicon esculentum* "rutgers" y siguiendo el protocolo OP70. Las tres primeras inoculaciones son hechas bajo la supervisión de HQU.

- e) Si el clon resulta negativo para la Prueba A y B, multiplicar el stock y someterlo a la prueba de detección de bacteria usando un medio nutritivo (NB) [5.0 g/L peptona, 1.0 g/L extracto de carne, 2.0 g/L extracto de levadura, 10.0 g/L glucosa, y 5.0 g/L Cloruro de Sodio a un pH 7.0] y agar nutritivo (ND) suplementado con 1% D-glucosa. Incubar los cultivos a 32-34 °C y 21 °C respectivamente por 21 días. Si el clon resulta negativo, la accesión es declarada HS2 y es incluida en el banco de germoplasma *in vitro*.
- f) Los clones que resultaron positivos a la prueba de detección de bacteria (medio turbio) son sometidos al proceso de eliminación de bacteria.
- g) Las accesiones que resultaron positivas a la Prueba B son sometidas al protocolo de eliminación de virus.

#### Eliminación de virus: termoterapia, aislamiento y cultivo de meristemos

- a) Multiplicar el stock HS0 de la plántula en 4 tubos de ensayo de 25x150mm con un medio MSA, colocando 4 explantes por cada tubo de ensayo.
- b) Plántulas *in vitro* son sometidas de 3-4 semanas a termoterapia a 32-34°C durante 1 mes.
- c) Seis meristemos de 0.1-0.3 mm de longitud, que comprende la cúpula meristemática más uno o dos primordios foliares, son extraídos usando un mango de bisturí con hojas (No. 11) y cultivados en tubos de ensayo de 13x100mm con un medio de meristemos de papa (Tabla 2)
- d) Los meristemos son subcultivados a los 3, 6, y 9 días después de la extracción, luego cada 7, 10 ó 15 días, hasta que una plántula es obtenida con raíz y por lo menos 3 nudos.

#### Diagnóstico final

- a) Después que las plántulas son obtenidas del cultivo de meristemos, seleccionar el clon con mejor desarrollo de crecimiento y multiplicar en 4 tubos.
- b) Repetir la prueba de estado sanitario, como arriba, para detectar alguna infección viral remanente.
- c) Si el clon resulta negativo para la Prueba A y B, multiplicar el stock y someterlo a la prueba de detección de bacteria usando medio nutritivo (NB) [5.0 g/L peptona, 1.0 g/L extracto de carne, 2.0 g/L extracto de levadura, 10.0 g/L glucosa, y 5.0 g/L Cloruro de Sodio a un pH 7.0]. Incubar los cultivos a 32-34 °C por 48 h y luego por 3 semanas a 19-21 °C. Si el clon resulta negativo, la accesión es declarada HS2 (ver tabla 1) y es incluido en el banco de germoplasma *in vitro*. La verificación de identidad deberá ser aplicada en estos materiales antes de su distribución.
- d) Los clones que resultaron positivos a la prueba de detección de bacteria (medio turbio) son sometidos al proceso de eliminación de bacteria (OP52).
- e) Si el clon resultó positivo para las Pruebas A o B, seleccionar otro clon y repetir el análisis de estado sanitario.
- f) Si los 6 clones resultan positivos a las pruebas A o B, las accesiones deberán entrar nuevamente al proceso de limpieza (termoterapia y cultivo de meristemos)

Cultivo categoría HS1 son aquellos genotipos probados negativos por serología (ELISA) a los virus económicamente más importantes tales como son PLRV, PVY, PVX, PVS, APMoV, APLV, PYV y AVB-O; y probados negativos por NASH para PSTVd y PVT.

Genotipos Categoría HS2 son aquellos libres de todos los virus de papa reportados, viroides y fitoplasmas. El diagnóstico es hecho por la combinación de: observación sintomatológica, ELISA, prueba de Nash, prueba de infectividad en un rango seleccionado de huéspedes indicadores de virus.

**Tabla 1.** Lista de virus de papa para clones indexados como HS1 o HS2  
 || Cultivo || Categoría HS1\* || Categoría HS2\* ||

|        |  |   |
|--------|--|---|
| Potato | Genotipos probados negativos por serología (ELISA) para los virus de papa económicamente más importantes incluyendo PVX, PVY, PLRV, PVS, APMoV, APLV, PYV, AVB-O; y probados negativos por NASH para PSTVd y PVT | Genotipos libres de todos los virus de papa reportados, viroides y fitoplasmas. El diagnóstico es hecho por la combinación de: observación sintomatológica, prueba de ELISA, prueba de Nash, prueba de infectividad en un rango seleccionado de huéspedes indicadores de virus. |
|--------|--|---|

\* Estos materiales no deberían mostrar síntomas o signos de bacterias o patógenos fúngicos.

**Tabla 2.** Composición de medio de multiplicación y meristemos para cultivo *in vitro* de papa  
 || Componentes || Medio de meristemo(MMP) || Medio de multiplicación (MSA) ||

|                         | Cantidad | Cantidad |
|-------------------------|----------|----------|
| sales MS(g/L) *         | 4.33     | 4.33     |
| Acido giberélico        | 0.1      | 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      |
| Sucrosa (g/L)           | 25       | 25       |

|                      |     |     |
|----------------------|-----|-----|
| Leche de coco (mL/L) | 20  | -   |
| Fitigel (g/L)        | 3   |     |
| Agar (g/L)           | -   | 6   |
| pH                   | 5.6 | 5.6 |

\*Sales basales Murashige and Skoog (1962)