



Detección de virus en camote (*Ipomoea batatas* L.) mediante qPCR¹

Detection of viruses in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) using qPCR

Ingrid Varela-Benavides², Carla Trejos-Araya²

¹ Recepción: 19 de junio, 2019. Aceptación: 25 de setiembre, 2019. Este trabajo formó parte de los resultados del proyecto de investigación "Detección de diferentes virus en camote (*Ipomoea batatas*), mediante qPCR multiplex", financiada por la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

² Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Florencia, Alajuela, Costa Rica. Tel: (506) 2401-3224. invarela@itcr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-1210-2664>), catrejos@itcr.ac.cr

Resumen

Introducción. El camote (*Ipomoea batatas*) es un cultivo muy susceptible a las enfermedades virales, las cuales se han asociado con una disminución del rendimiento del cultivo mayor al 50 %. En las plantaciones de camote costarricenses se ha reportado la presencia del virus del moteado plumoso (SPFMV), el virus del enanismo clorótico (SPCSV) y el virus del enrollamiento de la hoja (SPLCV); para el desarrollo de programas adecuados de control de estos virus, es necesaria la detección e identificación temprana mediante el uso de técnicas sensibles y eficientes. **Objetivo.** El objetivo de esta investigación fue estimar la incidencia del SPFMV, el SPCSV y el SPLCV en plantaciones de camote mediante qPCR. **Materiales y métodos.** En el 2018 se recolectaron muestras de tejido foliar de ochenta plantas con síntomas de infección viral en veinticinco plantaciones de camote distribuidas en cuatro provincias de Costa Rica. La detección de los tres virus se llevó a cabo mediante qPCR con el empleo de imprimadores y sondas de hidrólisis específicos. **Resultados.** En el 92 % de las plantaciones analizadas se encontró la presencia de virosis. La enfermedad viral del camote (SPVD), definida como la infección combinada del SPFMV y el SPCSV, fue la que se detectó con más frecuencia. Las plantaciones ubicadas en las localidades de Sabanilla, El Cacao y La Guácima de Alajuela fueron las únicas en presentar los tres virus estudiados. El virus SPLCV solamente fue detectado en las provincias de Limón y Alajuela. **Conclusión.** Es posible realizar una detección temprana de tres de los virus más frecuentes en camote con el empleo de qPCR, lo que contribuiría con los programas de producción de semilla certificada.

Palabras clave: virosis, PCR Múltiple, batata, Costa Rica, hortaliza de raíz.

Abstract

Introduction. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is a root crop very susceptible to viral diseases, which have been associated with crop yield reductions of over 50 %. In the Costa Rican sweet potato plantations the presence of feathery mottle virus (SPFMV), chlorotic stunt virus (SPCSV), and leaf curl virus (SPLCV) have been reported, for the development of adequate control programs, early detection and identification is necessary through the use of sensitive and efficient techniques. **Objective.** The objective of this research was to estimate the incidence of SPFMV, SPCSV, and SPLCV in sweet potato plantations using qPCR. **Materials and methods.** In 2018 foliar tissue samples



were collected from eighty plants showing viral symptoms from twenty-five sweet potato plantations distributed in four provinces in Costa Rica. The detection of the three viruses was performed by qPCR with the use of primers and specific hydrolysis probes. **Results.** In 92 % of the plantations studied, the presence of virosis was found. The Sweet potato virus disease (SPVD) defined as the combined infection of SPFMV and SPCSV, was the most common viral disease found in all plantations. The plantations located in Sabanilla, El Cacao, and La Guacima were the only ones to present the three viruses studied. The SPLCV virus was only detected in the Limón and Alajuela provinces. **Conclusion.** It is possible to make an early detection of three of the most frequent sweet potato viruses with the use of qPCR which would contribute to certified seed production programs.

Keywords: viruses, Multiple PCR, sweet potato, Costa Rica, root vegetable.

Introducción

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es uno de los tubérculos más importantes a nivel mundial, es cultivado en muchas regiones tropicales y subtropicales (Kays, 2005; Opiyo et al., 2010). Se considera que tiene un papel fundamental en la seguridad alimentaria en muchos países en vía de desarrollo a nivel mundial, especialmente en África (Arkorkorful y Addae-Frimpomaah, 2015; Barkessa, 2018). Sin embargo, es un cultivo susceptible a muchas enfermedades virales, las cuales se han asociado con una disminución del rendimiento del cultivo mayor al 50 % (Gibson et al., 1998; Clark y Hoy, 2006), así como con una reducción en el número de plantaciones a nivel mundial (Clark y Valverde, 2009).

Se han descrito alrededor de treinta virus distintos en camote (Clark et al., 2012), de estos, el virus del moteado plumoso [(Potyviridae, *Potyvirus*, *Sweet potato feathery mottle virus* SPFMV)], es el más común y está distribuido ampliamente a nivel mundial (Alam et al., 2013); este virus interactúa sinérgicamente con el virus del enanismo clorótico [(Closteroviridae, *Crinivirus*, *Sweet potato chlorotic stunt virus* SPCSV)], que provoca la enfermedad viral del camote (SPVD) (Gibson et al., 1998; Kokkinos y Clark, 2006). Esta última es considerada como la enfermedad más importante presente en camote, puede causar hojas pequeñas y delgadas, un retraso en el crecimiento de la planta, con presencia de un moteado clorótico en las hojas, o bien, decoloración de la nervadura (Gibson et al., 2004). Otro de los virus reportados en diferentes regiones nivel mundial es el virus del enrollamiento de la hoja del camote [(Geminiviridae, *Begomovirus*, *Sweet potato leaf curl virus* SPLCV)] (Valverde y Moreira, 2004; Clark et al., 2012). En Costa Rica, Valverde y Moreira (2004) reportaron la presencia de estos tres virus, con altas tasas de infección de SPFMV y SPCSV, así como de la enfermedad viral del camote (SPVD).

Entender la biología de estos virus es fundamental para el desarrollo de programas adecuados para su control, y para ello, es necesaria la detección e identificación temprana mediante el uso de técnicas precisas, confiables y eficientes. Los métodos para detección incluyen pruebas serológicas (ELISA) y moleculares (PCR). La detección por medio de estas técnicas es indispensable, ya que los síntomas provocados por las virosis son variables y pueden ser confundidos con otras patologías (Lotrakul et al., 2003; Webster et al., 2004); además, estos virus suelen estar presentes en concentraciones bajas y con presencia de inhibidores en concentraciones muy altas, lo que hace que su detección sea un reto (Clark et al., 2012).

El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico viral en camote ha sido utilizado por Fenby et al. (1998), Valverde y Moreira (2004) y Kokkinos y Clark (2006), con buenos resultados. También, otros autores han diseñado protocolos para la detección de virus en camote mediante qPCR multiplex, mediante el diseño exitoso de protocolos para la detección de los virus SPFMV y SPCSV en Kenia (Opiyo et al., 2010) y los virus SPFMV [(sweet potato virus C) (SPVC), sweet potato virus G (SPVG) y sweet potato virus 2 (SPV2)] en China (Li et al., 2012).

En Costa Rica, la presencia de la enfermedad viral del camote y de otros posibles virus, así como la aparición de nuevos biotipos para los vectores de algunos de estos, como la mosca blanca, presentan una seria amenaza al cultivo del camote, por lo que se requiere del desarrollo de métodos de detección de cada uno de los virus, tanto conocidos como no (Valverde y Moreira, 2004). Cuando se evaluó la presencia de algunos virus en plantaciones camoterías en San Carlos mediante ELISA, se indicó la necesidad de contar con técnicas modernas, sensibles y eficientes en la evaluación de material propagativo de camote (Torres et al., 2013).

Dada la relevancia del desarrollo de técnicas de detección temprana de estos virus y la eficacia comprobada del uso de qPCR, el objetivo principal de esta investigación fue estimar la incidencia del SPFMV, el SPCSV y el SPLCV en plantaciones de camote, mediante qPCR.

Materiales y métodos

Colecta de muestras

Las muestras fueron colectadas en plantaciones de camote ubicadas en cinco localidades en Costa Rica durante el primer semestre del 2018. En cada plantación se colectó tejido de plantas que presentaran algún síntoma de infección viral. El número de muestras tomadas en cada plantación fue determinado según el número de parches con diferente sintomatología en la misma, una planta por parche (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cantidad de muestras de tejido foliar de camote (*Ipomoea batatas*) colectadas en plantaciones en cinco localidades de Costa Rica. I semestre, 2018.

Table 1. Number of foliar tissue samples of sweet potato (*Ipomoea batatas*) collected in plantations in five different locations of Costa Rica. I semester, 2018.

Localidad	Muestras	Plantaciones
San Carlos	21	11
Alajuela	16	4
Bagaces	4	1
Guápiles	16	6
Cartago	23	3
Total	80	25

Para cada planta con síntomas, se tomó una fotografía del área foliar de donde se iba a obtener la muestra; posteriormente, se limpió el área a muestrear con etanol al 70 % y con un sacabocados, se extrajeron un total de ocho círculos, con un diámetro de 0,8 cm cada uno, de tejido foliar distribuidos en toda la lámina de la hoja. Se tomaron dos muestras por cada planta, con un peso aproximado de 100 mg cada una.

Las muestras fueron trasladadas a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, ubicado en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Estas se almacenaron a una temperatura de -30 °C hasta su procesamiento.

Diseño de imprimadores, sondas de hidrólisis y controles positivos

Los imprimadores, sondas de hidrólisis y fragmentos de ADN utilizados como controles positivos se presentan en el Cuadro 2. El diseño de estos oligonucleótidos y fragmentos de ADN se realizó mediante la herramienta IDT Primer Quest (IDT City, CA) (Predesigned qPCR Assays®), siguiendo las instrucciones del desarrollador. Los sets de imprimadores y sondas sugeridos por la herramienta se compararon con las secuencias disponibles en el GenBank utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990), disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el objetivo de descartar sets de imprimadores y sonda no específicos. Posteriormente, con los sets seleccionados se realizaron amplificaciones con controles negativos y los fragmentos de ADN diseñados como controles positivos.

Cuadro 2. Imprimadores, sondas y controles positivos diseñados para la detección de los virus del camote moteado plumoso (SPFMV), virus del enanismo clorótico (SPCSV) y del enrollamiento de la hoja (SPLCV), en Costa Rica. Mayo, 2019

Table 2. Primers, probes, and positive controls designed for the detection of the sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV), and sweet potato leaf curl virus (SPLCV), in Costa Rica. May, 2019.

Virus	Secuencia de los imprimadores, sondas y controles positivos*	Tamaño del producto de PCR
SPFMV	F: GGATCATGCAGTGCCTACTT R: CCTTGGTGCGATTTCTCATTTT Sonda: TGACACACTTCAGTGACGTTGCTGA Secuencia control: CCATAAAGCCATTACTGGATCATGCAGTGCCTACTT TTAGGCAAATCATGACACACTTCAGTGACGTTGCTGAAGCGTATATAGA <u>AATGAGAAATCGCACCAAGGCATATATGCCTAGGTATGGA</u>	89
SPCSV	F: CAGTACGGTAGTTGAGAAGCAT R: CGAATCAACGGATCGGAATTTATC Sonda: AGCACCACCGACTATTACATCACCAC Secuencia control: AAGTCCTTCGAATCAACGGATCGGAATTTATCCCAACGT GTTTATCTATTACTAAGAGTGGTGATGTAATAGTCGGTGGTGCTGCACAAGT GTTAGATGCTTCTCAACTACCGTACTGTTACTTCTACG	110
SPLCV	F: CAGTTCCTTGGCGATGTGTATG R: CTTATCCACGCTGTTCTCTCTC Sonda: TTAGGAGTTGGGCTAGGCAGTCCT Secuencia control: CCATCCTCGTGCAGTTCCTTGGCGATGTGTATGTATTT TTTGTGGTGGGTGTTTGGATATTTAGGAGTTGGGCTAGGCAGTCCTCTTT <u>TGAGAGAGAACAGCGTGGATAAGTAATAAAAATAATT</u>	101

* Las bases en itálica y subrayadas indican dónde se alinean los imprimadores y sonda / The italic and underlined bases indicate where the primers and probe are aligned.

Extracción de ácidos nucleicos totales (ANT)

La extracción de los ácidos nucleicos totales (ANT) se realizó mediante la metodología propuesta por Gibbs y Mackenzie (1997). Cada muestra se maceró en buffer de extracción (CTAB 2 %, NaCl 1,4 M, Tris HCl pH 8 0,1 M y 0,5 % de mercaptoetanol), con un molino de balines a 1700 rpm por 45 s. Después de incubar a 55 °C por 30 min, se separó las proteínas de los ANT, mediante extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugado. Para precipitar los ANT se utilizó acetato de amonio 7,5 M e isopropanol. El precipitado de ANT se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 50 µl de agua calidad PCR. Los ANT extraídos se almacenaron a -20 °C hasta las reacciones de transcripción inversa.

Obtención del ADNc

Los ácidos nucleicos totales extraídos se sometieron a transcripción inversa utilizando la M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante para la obtención de ADNc. La mezcla de reacción contenía 1X de buffer de reacción de la transcriptasa inversa, 20 U de RiboLock inhibidor de la ARNasa, 1 mM de dNTP's, 0,5 µM del imprimador aleatorio para cada virus, 100 U de transcriptasa inversa, 2 µl de ANT y agua hasta alcanzar un volumen de 10 µl. Las reacciones se colocaron por una hora a 42 °C y luego por 10 min a 70 °C, en un termociclador. Como control adicional de la especificidad de los imprimadores diseñados, se preparó una reacción con ANT de una planta infectada con virus y sin la enzima transcriptasa inversa. Los productos de la transcripción inversa se almacenaron a -20 °C hasta la preparación de la reacción de qPCR.

qPCR

Las reacciones de qPCR se prepararon en un volumen de 10 µl conteniendo 1X de mezcla para reacción GoTaq Probe qPCR Master Mix, 500 nM de cada uno de los imprimadores, 200 nM de sonda de hidrólisis y 2 µl de ADNc (para el SPFMV y el SPCSV) o 2 µl de ANT (para el SPLCV). El ciclo de temperaturas consistió de una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 20 s, 60 °C por 1 min y 72 °C por 20 s. El análisis de la amplificación se llevó a cabo en un termociclador para PCR en tiempo real (StepOne™ de Applied Biosystems). La detección del SPFMV y el SPCSV se realizó en una única reacción de PCR múltiple, mientras que el SPLCV se evaluó en una reacción separada.

Obtención de secuencias

Para confirmar la validez del protocolo, se prepararon nuevas reacciones de PCR con los productos de la transcripción inversa de muestras que resultaron positivas, y los amplicones resultantes se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur). Para esto se prepararon reacciones de 50 µl que contenían 1X del buffer de la polimerasa, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP's, 0,5 µM de cada uno de los imprimadores, 2 U Taq Polimerasa y 5 µl del producto de transcripción inversa.

Las reacciones se colocaron en un termociclador y se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 1 min y polimerización a 72 °C por 30 s. Para finalizar, se realizó un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR obtenidos se

separaron en un gel de agarosa al 1,8 % en buffer TAE (1X) y tiñeron con gel red para su visualización. Seguidamente se purificaron por medio del kit de purificación para productos de PCR (NucleoSpin® Gel y PCR Clean-up).

Una vez obtenidas las secuencias, se editaron con la ayuda del programa BioEdit (Hall, 1999) y se compararon con las secuencias reportadas en el GenBank, mediante el empleo de la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990).

Análisis

Los sitios donde hubo detección de los virus se ubicaron en mapas para mostrar la distribución geográfica, y la incidencia (número de casos detectados), por localidad y por sistema productivo. Para la elaboración de los mapas se utilizaron las capas: relieve (CATIE, 2014), borde continental (Proyecto Atlas Digital CR, 2008-2014) y provincias (Geotecnologías, 2014), y el software QGIS versión 3.4.4. (QGIS Development Team, 2019).

Resultados

La presencia de virosis en las plantaciones fue generalizada, del total de plantaciones muestreadas solo en dos de ellas no se encontró ninguno de los virus estudiados (Figura 1). Por otro lado, fue muy común la presencia de al menos dos virus en una misma planta. La combinación de SPFMV y SPCSV, conocida como la enfermedad viral del camote (SPVD), fue la infección detectada más frecuentemente, con un 29 % del total de muestras colectadas positivas (Cuadro 3). Si a estas se suman las muestras en las que se detectó la combinación de los tres virus (SPVD+SPLCV), el porcentaje aumentaría a 39 % de las muestras.

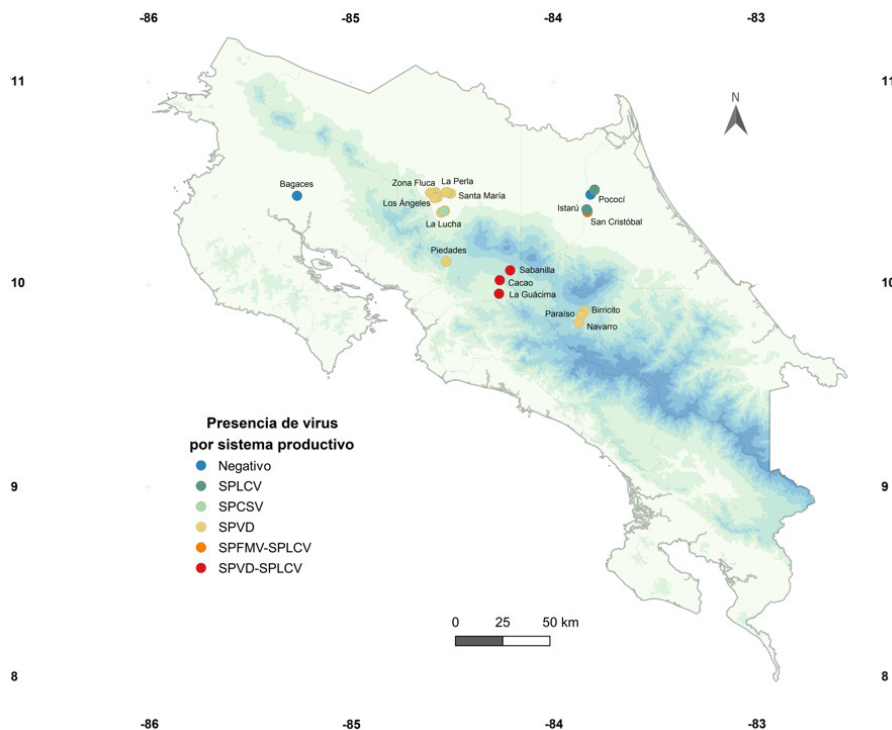


Figura 1. Virosis en sistemas productivos de camote (*Ipomoea batatas* L.), en diferentes localidades de Costa Rica. Mayo, 2019.

Figure 1. Viruses in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) productive systems in different locations of Costa Rica. May, 2019.

Cuadro 3. Frecuencia de virus detectados en muestras colectadas en sistemas productivos de camote (*Ipomoea batatas* L.), en diferentes localidades de Costa Rica. Se indica el número de muestras y, entre paréntesis, el porcentaje que estas representan del total de muestras colectadas en cada localidad. Mayo, 2019.

Table 3. Frequency of viruses detected in samples collected in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) production systems in different locations of Costa Rica. The number of samples is indicated and, in parentheses, the percentage they represent from the total of samples collected in each location. May, 2019.

Localidad	SPFMV	SPCSV	SPLCV	SPVD	SPFMV-SPLCV	SPCSV-SPLCV	SPVD-SPLCV	Negativos
San Carlos	0	6 (28,6)	0	15 (71,4)	0	0	0	0
Alajuela	0	0	2 (12,5)	1 (6,25)	2 (12,5)	2 (12,5)	8 (50)	1 (6,25)
Bagaces	0	0	0	0	0	0	0	4 (100)
Pococí	0	0	8 (50)	0	3 (18,7)	0	0	5 (31,3)
Cartago	1 (4,3)	12 (52,2)	0	7 (30,5)	0	0	0	3 (13,0)

Los resultados generales obtenidos deben ser analizados con discreción, porque se observaron claras diferencias entre las localidades camotereras estudiadas. Como puede observarse en las Figuras 2, 3 y 4, la tendencia fue la presencia de SPVD en Cartago y San Carlos, la combinación de los tres virus en Alajuela, el SPLCV en las zonas de Pococí y Piedades de Alajuela, y solamente en dos plantaciones no se detectó ningún virus, en la única plantación muestreada en Bagaces y una en Pococí. Alajuela fue la única localidad donde se encontraron los tres virus estudiados en plantas distintas. El SPFMV se detectó mayormente en infecciones combinadas con otros virus,

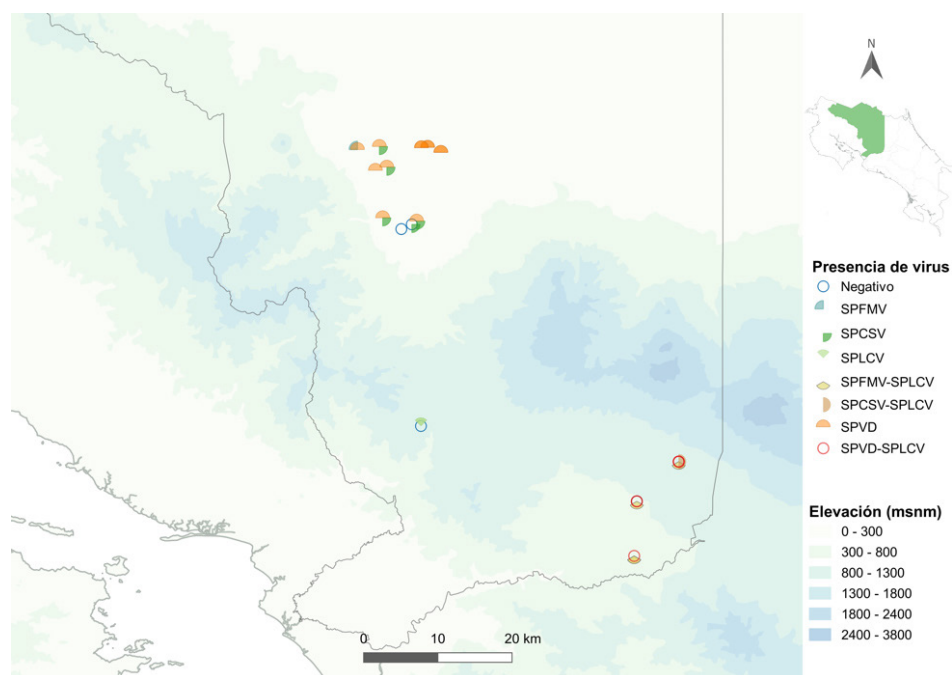


Figura 2. Virosis en sistemas productivos de camote (*Ipomoea batatas* L.), en Alajuela, Costa Rica. Mayo, 2019.

Figure 2. Viruses in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) productive systems in Alajuela, Costa Rica. May, 2019.



Figura 3. Virosis en sistemas productivos de camote (*Ipomoea batatas* L.), en Cartago, Costa Rica. Mayo, 2019.

Figure 3. Viruses in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) productive systems in Cartago, Costa Rica. May, 2019.

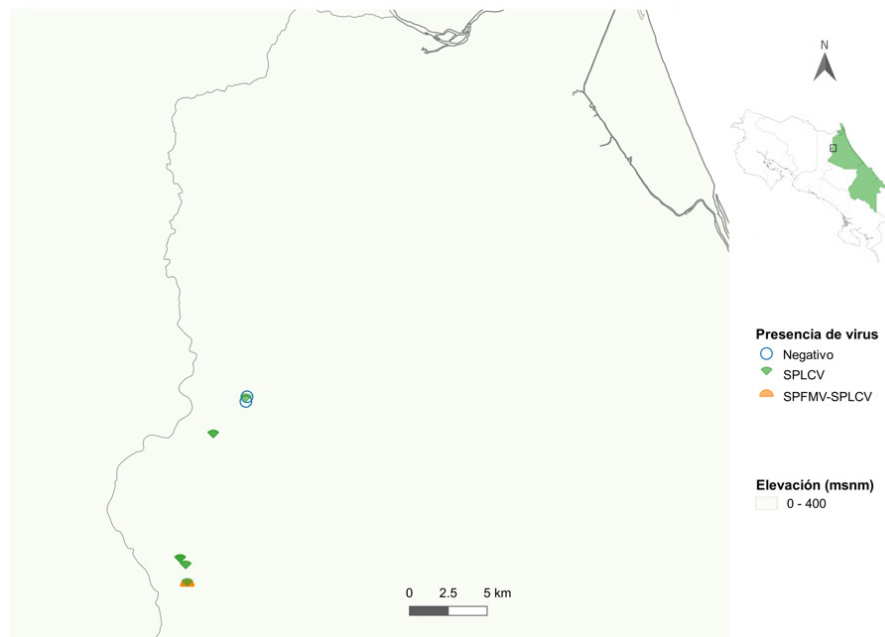


Figura 4. Virosis en plantaciones de camote (*Ipomoea batatas* L.), en Limón, Costa Rica. Mayo, 2019.

Figure 4. Viruses in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plantations in Limón, Costa Rica. May, 2019.

mientras que el SPCSV y el SPLCV se encontraron tanto en plantas individualmente como con algún otro de los virus estudiados.

En las plantaciones se observaron plantas con crecimiento reducido, tonalidades moradas o lilas y corrugamiento de las hojas (Figura 5). Sin embargo, también se detectaron virosis en plantas con sintomatología leve o muy leve, y se observó en las plantaciones daño por insectos y síntomas asociados a deficiencias nutricionales que podrían confundirse con virosis pero que resultaron libres de virus según los análisis.

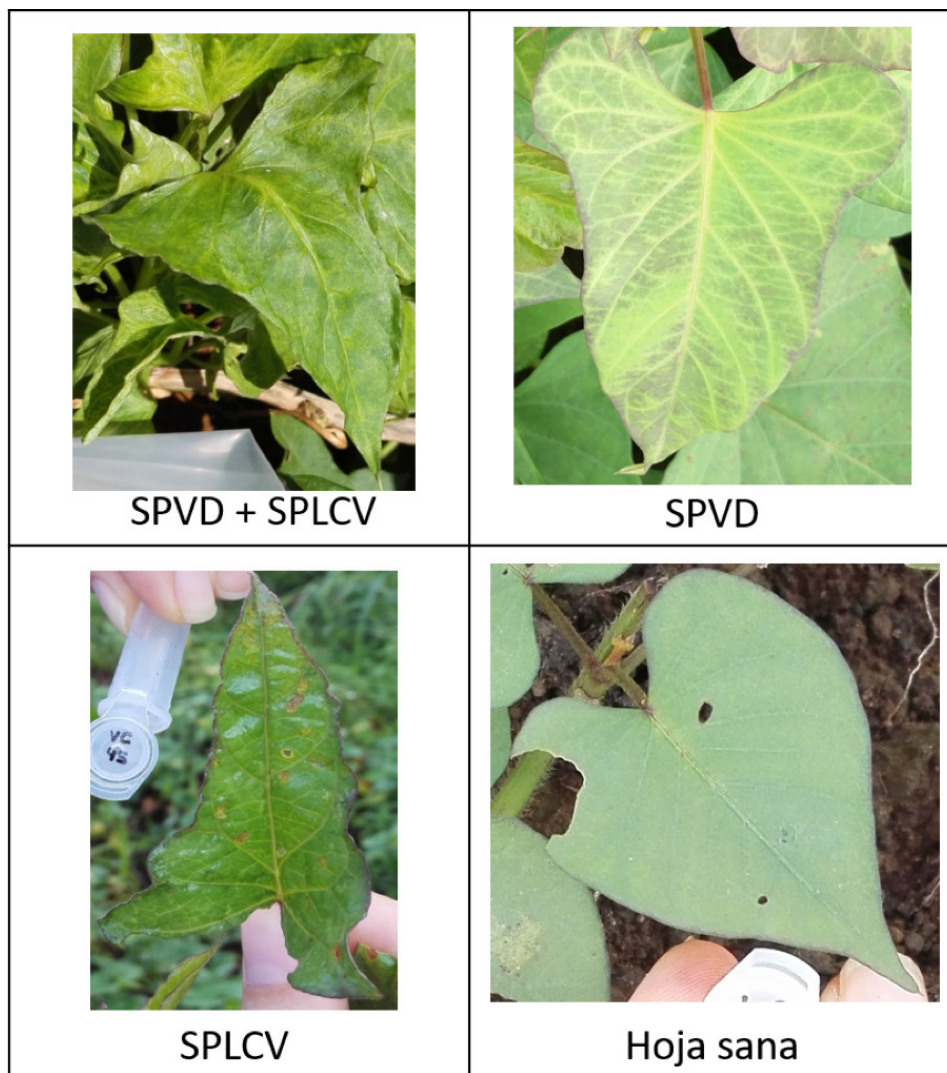


Figura 5. Síntomas observados en plantas de camote (*Ipomoea batatas* L.) afectadas por virosis. Costa Rica. Mayo, 2019.

Figure 5. Symptoms observed in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) plants affected by virosis. Costa Rica. May, 2019.

La técnica utilizada permitió la detección de los virus estudiados de forma fácil y expedita. En este caso, además, se realizó la detección del SPCSV y el SPFMV de forma simultánea (Figura 6), lo que permitió abaratar los costos y el tiempo de detección. Las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR permitieron validar el protocolo de detección. Al comparar las mismas contra las bases de datos del GenBank la secuencia obtenida del SPLCV (100 %) con la secuencia completa reportada por Pardina et al. (2012) para plantaciones en Argentina (accesión JQ349087), y la secuencia obtenida para el SPCSV coincide (100 %) con la accesión KU511274 del segmento Can181-9/AM-MB2. La secuencia obtenida para el SPFMV coincidió en un 98,9 % con la accesión MG656418 reportada por Maina et al. (2018), lo que debe ser motivo de futuras investigaciones, ya que este potyvirus es reconocido por presentar variación genética que puede estar relacionada con la severidad de la infección y con la forma de interactuar con otros virus (Untiveros et al., 2008).

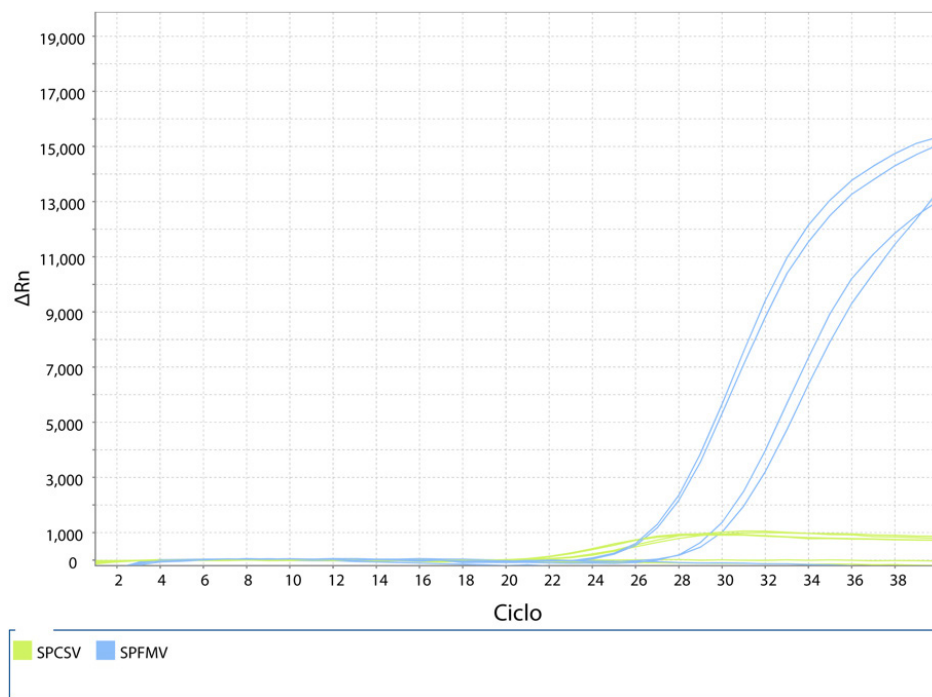


Figura 6. Curvas de amplificación de SPCSV y SPFMV a partir del ADNc en muestras de camote (*Ipomoea batatas* L.). Costa Rica, mayo 2019.

Figure 6. Amplification curves of SPCSV and SPFMV from cDNA in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) samples. Costa Rica, May 2019.

Discusión

La incidencia observada en las plantaciones camoterías coincidió parcialmente con los resultados presentados por Valverde y Moreira (2004). Los resultados del presente trabajo sugieren que la SPVD es la virosis más frecuente en las plantaciones, con una alta incidencia en el Valle Central; sin embargo, se detectó una mayor incidencia del SPLCV en infecciones combinadas con los demás virus en Alajuela, e individualmente en la localidad de Pococí,

Limón. Además, se presentaron los datos de la incidencia viral en la zona de San Carlos, la cual no había sido estudiado por Valverde y Moreira (2004), y donde no se había reportado la presencia del SPCSV en las plantaciones.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la afectación por virus en las plantaciones de camote, lo que podría deberse a un aumento de la incidencia o a una mejor detección, debido al uso de técnicas más modernas y sensibles. En cualquier caso, es evidente que el problema de virosis en camote no ha sido atendido apropiadamente desde que Valverde y Moreira (2004) realizaron el primer estudio de presencia de virus en plantaciones de camote en Costa Rica. La incidencia de la SPVD, que es una de las más devastadoras en el cultivo (Gutiérrez et al., 2003; Kokkinos y Clark, 2006; Valverde et al., 2007), mantiene su importancia en las localidades camoterías de Costa Rica y también en otros países.

Las variedades utilizadas por los productores no son resistentes o tolerantes a los virus, por lo que la propagación de los mismos podría deberse, en mayor parte, al uso de semilla infectada y a la transmisión por insectos vectores. La detección temprana, es la medida de control a elegir en estos casos (Castillo-Matamoros et al., 2014; Figueroa-Escudero, 2015). Junto con la concientización sobre la importancia de la calidad de la semilla propagativa, es importante que se le ofrezca al productor semilla de calidad, sana y accesible. Los resultados resaltaron la importancia de contar con métodos de evaluación de sanidad y productividad como el aquí estudiado.

El uso de qPCR para la detección de los virus permitió una detección rápida y confiable, además de simultánea, de los virus que causan la SPVD. También logró abaratar los costos de detección, al disminuir la cantidad de reactivos necesarios para la misma. Estos protocolos pueden detectar picogramos o nanogramos de virus en material vegetal (INIA, 2010).

El procedimiento podría simplificarse aún más con el uso de productos especializados para RT-qPCR múltiple disponibles en el mercado, los cuales permiten la realización de la reacción de transcripción inversa y PCR en una única reacción. En este trabajo, sin embargo, esta opción fue desestimada por los altos costos que representan tales productos.

Conclusiones

El virus del moteado plumoso (SPFMV), el virus del enrollamiento de la hoja (SPCSV) y el virus del enanismo clorótico (SPLCVP), fueron detectados en varias localidades camoterías costarricenses, la SPVD fue la virosis detectada con mayor frecuencia en las muestras.

Es posible realizar una detección temprana de tales virosis con el empleo de qPCR, lo que contribuiría con los programas de producción de semilla certificada.

Literatura citada

- Alam, I., S.A. Sharmin, M.K. Naher, M.J. Alam, M. Anisuzzaman, and M.F. Alam. 2013. Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweet potato as a low-cost option toward commercialization. *3 Biotech* 3:153-164. doi:10.1007/s13205-012-0080-6
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Arkorful, E., and F. Addae-Frimpomaah. 2015. Detection of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf Curl Virus (SPLCV) in Ghana using visual symptomatology and PCR technique. *Int. J. Plant Breed. Genet.* 9:106-115. doi:10.3923/ijpb.2015.106.115

- Barkessa, M.K.E. 2018. A review on sweet potato (*Ipomoea batatas*) viruses and associated diseases. *Int. J. Res. Agric. For.* 5(9):1-10.
- Castillo-Matamoros, R., A. Brenes-Angulo, P. Esker, y L. Gómez-Alpizar. 2014. Evaluación agronómica de trece genotipos de camote (*Ipomoea batatas* L.). *Agron. Costarricense* 38(2):67-81.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2014. *Relieve2008crtm05. Atlas CR 2014.* [CD]. ITCR, Cartago, CRI.
- Clark, C.A., J.A. Davis, S.B. Mukasa, J. Abad, A.K. Tugume, W.J. Cuellar, S. Fuentes, J.F. Kreuze, F.D. Tairo, R.W. Gibson, and J.P.T. Valkonen. 2012. Sweet potato viruses: 15 Years of progress on understanding and managing complex diseases. *Plant Dis.* 96:168-184. doi:10.1094/PDIS-07-11-0550
- Clark, C.A., and M.W. Hoy. 2006. Effects of common viruses on yield and quality of Beauregard sweet potato in Louisiana. *Plant Dis.* 90:83-88. doi:10.1094/PD-90-0083
- Clark, C.A., and R.A. Valverde. 2009. Viruses and sweet potato cultivar decline in Louisiana USA. In: Y. Nakazawa, and K. Ishiguro, editors, *Proceedings of International workshop sweet potato cultivar decline study.* Kyushu National Agricultural Experiment Station (KNAES), Miyakonjo, JPN. p 62-69.
- Fenby, N.S., S. Seal, R.W. Gibson, and G.D. Foster. 1998. RNA extraction from virus-diseased sweet potato for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Mol. Biotechnol.* 10:187-190. doi:10.1007/BF02760865
- Figuroa-Escudero, S.E. 2015. Evaluación de dos sistemas de producción de semilla prebásica de camote (*Ipomoea batatas* L.). Tesis Lic., Universidad Agraria La Molina, Lima, PER.
- Gibbs, A., and A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63:9-16. doi:10.1016/S0166-0934(96)02103-9
- Gibson, R.W., V. Aritua, E. Byamukama, I. Mpenbe, and J. Kayongo. 2004. Control strategies for sweet potato virus disease in Africa. *Virus Res.* 100:115-122. doi:10.1016/j.virusres.2003.12.023
- Gibson, R.W., I. Mpenbe, T. Alicai, E.E. Carey, R.O.M. Mwanga, S.E. Seal, and H.J. Vetten. 1998. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda. *Plant Pathol.* 47:95-102. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00196.x
- Geotecnologías. 2014. *Provincias2014crtm05. Atlas CR 2014.* [CD]. ITCR, Cartago, CRI.
- Gutiérrez, D.L., S. Fuentes, and L.F. Salazar. 2003. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru. *Plant Dis.* 87:297-302. doi:10.1094/PDIS.2003.87.3.297
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). 2010. XX Curso internacional teórico práctico de detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas. INIA, Madrid, ESP.
- Kays, S.J. 2005. Sweet potato production worldwide: Assessment, trends and the future. *Acta Hort.* 670:19-25. doi:10.17660/ActaHortic.2005.670.2
- Kokkinos, C.D., and C.A. Clark. 2006. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. *Plant Dis.* 90:783-788. doi:10.1094/PD-90-0783
- Li, F., R. Zuo, J. Abad, D. Xu, G. Bao, and R. Li. 2012. Simultaneous detection and differentiation of four closely related sweet potato potyviruses by a multiplex one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods* 186:161-166. doi:10.1016/j.jviromet.2012.07.021.

- Lotrakul, P., R.A. Valverde, C.A. Clark, and C.M. Fauquet. 2003. Properties of a Begomovirus isolated from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] infected with sweet potato leaf curl virus. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(2):128-136.
- Maina, S., M.J. Barbetti, D.P. Martin, O.R. Edwards, and R.A. Jones. 2018. New isolates of sweet potato feathery mottle virus and sweet potato virus C: biological and molecular properties, and recombination analysis based on complete genomes. *Plant Dis.* 102:1899-1914. doi:10.1094/PDIS-12-17-1972-RE
- Opiyo, S.A., E.M. Ateka, P.O. Owuor, L.O.A. Manguro, and D.W. Miano. 2010. Development of a multiplex PCR technique for simultaneous detection of Sweet potato feathery mottle virus and Sweet potato chlorotic stunt virus. *J. Plant Pathol.* 92:363-366. doi:10.4454/jpp.v92i2.178
- QGIS Development Team. 2019. QGIS User guide. Release 3.4. QGIS project. QGIS. <https://docs.qgis.org/3.4/pdf/en/QGIS-3.4-UserGuide-en.pdf> (accessed Apr.15, 2019).
- Pardina, P.R., A. Luque, C. Nome, E.L. Colomba, S.F. Delgado, and L. Di Feo. 2012. First report of Sweet potato leaf curl virus infecting sweet potato in Argentina. *Australas. Plant Dis. Notes* 7:157-160. doi:10.1007/s13314-012-0073-7
- Proyecto Atlas Digital CR. 2008-2014. Línea continental. Atlas CR 2014. [CD]. ITCR, Cartago, CRI.
- Torres, S., W. Montero, y I. Varela. 2013. Desarrollo de una metodología para el diagnóstico viral y la producción de plantas de camote libres de virus Código: 5402-2151-8701. Instituto Tecnológico de Costa Rica, CRI. https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/3237/desarrollo_metodologia_diagnostico_viral_produccion.pdf?sequence=1&isAllowed= (consultado 15 feb. 2019).
- Untiveros, M., S. Fuentes, and J. Kreuze. 2008. Molecular variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru. *Arch. Virol.* 153:473-483. doi:10.1007/s00705-007-0019-0
- Valverde, R., y M.A. Moreira. 2004. Identificación de virus en el cultivo de camote (*Ipomoea batatas* L.) en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 15:1-7. doi:10.15517/AM.V15I1.11921
- Valverde, R.A., C.A. Clark, and J.P.T. Valkonen. 2007. Viruses and virus disease complexes of sweet potato. *Plant Viruses* 1:116-126.
- Webster, C.G., S.J. Wylie, and M.G.K. Jones. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Curr. Sci.* 86:1604-1607.