

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN**

ESCUELA DE AGRONOMÍA

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO VIRAL Y LA
PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CAMOTE LIBRES DE VIRUS**

**CÓDIGO:
5402-2151-8701**

INVESTIGADOR RESPONSABLE

M.SC. SERGIO TORRES P.

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

M.SC. WAYNER A MONTERO C.

M.SC. INGRID VARELA B.

2013

ÍNDICE

Contenido	Página
DOCUMENTO I	
Resumen	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos específicos	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.1. Ubicación del estudio.	3
2.2. Identificar los principales virus del camote en la zona de estudio.	3
2.3. Desarrollar la metodología para la limpieza viral de las variedades De camote utilizadas en la región.	6
2.4. Desarrollar la metodología para la micropropagación del Camote libre de virus.	7
2.5. Banco germoplasma	7
2.6. Evaluar el comportamiento del material de camote libre de virus en el campo.	7
3. RESULTADOS	8
3.1. Ubicación del estudio.	8
3.2. Identificar los principales virus del camote en la zona de estudio.	8
3.3. Desarrollar la metodología para la limpieza viral de las variedades De camote utilizadas en la región.	9
3.4. Desarrollar la metodología para la micropropagación del Camote libre de virus.	10
3.5. Banco germoplasma	11
3.6. Evaluar el comportamiento del material de camote libre de virus en el campo.	12

4. CONCLUSIONES	14
5. RECOMENDACIONES	14
6. AGRADECIMIENTOS	14
7. BIBLIOGRAFÍA	14

TÍTULO

Desarrollo de una metodología para el diagnóstico viral y la producción de plantas de camote libres de virus.

AUTORES Y DIRECCIONES DE INVESTIGADORES PARTICIPANTES

Nombre	Grado académico	Dirección	
Sergio Torres P.	M.Sc.	Agronomía	Coordinador
Wayner Montero C	M.Sc.	Agronomía	
Ingrid Varela B.	M.Sc.	Agronomía	

RESUMEN

El objetivo general de este proyecto fue producir plantas de camote libre de virus. Para lograr este objetivo primero se identificaron los virus más comunes en los cantones de San Carlos y San Ramón (San Isidro de Peñas Blancas), utilizando la técnica NCM-ELISA, posteriormente se desarrolló un metodología para la limpieza viral, combinando la termoterapia con el cultivo de meristemas y se evaluó el crecimiento y la producción de esquejes provenientes de plantas libres de virus con esquejes provenientes de plantas de campo. Los resultados más importantes fueron, el principal virus detectado en la zona de estudio fue el SPFMV. El tratamiento de explantes a 40 °C por 10 h y posterior extracción del meristemo produjo un 100% plantas libres de virus según el análisis NCM-Elisa. Por último, los esquejes procedentes de plantas *in vitro* libre de virus mostraron un mejor crecimiento y producción que aquellas provenientes de plantas de campo.

Palabras clave:

Cultivo *in vitro*, camote, virus, ELISA, PCR-TR, banco germoplasma

1. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas*) pertenece a la familia de las convolvuláceas. Su origen es de América Tropical; sin embargo, su cultivo y utilización es más avanzado en zonas templadas, siendo los Estados Unidos y Europa los principales mercados (León, 1987). La producción mundial de camote ha venido al descenso, ésta pasó de 133 millones t a 126 millones t en un lapso de 20 años (1987 – 2007). Sin embargo, el rendimiento se ha mantenido casi constante (14,6 – 13,9 t/ha respectivamente) (FAO 2009). Esta raíz modificada es considerada el cuarto cultivo más importante en el mundo, después del arroz, el trigo y el maíz (Valverde y Moreira, 2005)

El camote es una de las principales fuentes de carbohidratos, vitaminas y minerales para los habitantes del trópico y subtropical. El alto contenido de vitamina A es la principal característica nutricional de este cultivo. Esta planta pertenece al grupo de las raíces y tubérculos tropicales, los cuales son fuente importante de la alimentación de muchos campesinos y además son una excelente alternativa de diversificación agrícola para la agricultura tropical, debido a que las raíces y tubérculos tropicales son cultivos no tradicionales de exportación. A pesar que la exportación es una muy buena alternativa, el principal mercado del camote es el nacional. El consumo nacional del camote ha decrecido en los últimos años. Del 2001 al 2004, el consumo pasó de 1.431 a 1.050 t, pero el precio tanto al productor como en la feria del agricultor se ha incrementado. En el caso del precio al productor pasó de ¢ 96 a ¢ 113 y al consumidor de ¢ 228 a ¢ 290. En cuanto a las exportaciones, éstas pasaron de 18,23 t a 244,08 t en un período de 5 años (1999 a 2003), mientras que el valor de las exportaciones en ese período pasó de \$ 11.000 a más de \$ 17.6000. Los principales mercados de exportación son Canadá, Holanda y Reino Unido

En Costa Rica, el camote se cultiva principalmente en la región Huetar Norte, Huetar Atlántica y el Valle Central. De acuerdo al MAG (2007), en la región Huetar Norte hay 118 productores, con un área de 137,9 ha de camote, siendo el cantón de San Carlos (64,2 Ha) el que tiene la mayor extensión, otros cantones con áreas importantes son San Ramón (Peñas Blancas) y Los Chiles, 27 y 23 ha respectivamente. El rendimiento promedio es de 8,4 t/ha.

El camote se propaga vegetativamente a través de las puntas de los tallos o bien a través de las raíces modificadas, lo cual facilita la diseminación de plagas y enfermedades, tales como las de origen viral. La principal enfermedad viral que afecta al camote es la enfermedad viral del camote, conocida como SPVD (siglas en inglés), el cual es resultado de una sinergia entre el virus del moteado plumoso del camote (SPFMV) y el virus de enanismo clorótica del camote (SPCSV), que puede devastar los cultivos. Otros virus que afectan al camote son: el virus de enrollamiento de la hoja del camote (SPLCV), el potyvirus latente de la Batata

(SwPLV) y Mancha suave de la Batata (SPMMV) (Valverde y Moreira, 2005, Vásquez y León, 2006). Los áfidos y la mosca blanca son los principales agentes transmisores de estos virus. En un reciente estudio realizado por Valverde y Moreira (2005) en plantaciones de camote en las zonas del Valle Central, Turrialba y Guápiles, encontraron que en el Valle Central existía hasta un 90% de las plantas infectadas con virus, mientras que las de las zonas de Turrialba y Guápiles el porcentaje era de 1%. Estos resultados se pueden justificar debido a que la zona del Valle Central estudiada (Alajuela) ha sido una zona tradicional de producción de este cultivo, mientras que las otras zonas estudiadas son áreas nuevas de producción. Los principales virus encontrados en este estudio fueron el SPFMV, SPCSV, SPLCV. En el caso de San Carlos no hay estudios sobre la presencia de virus, ni su efecto en la producción de camote. Sin embargo, los virus son considerados como uno de los principales factores que reducen el rendimiento y la calidad en camote (Valverde y Moreira, 2005)

Una alternativa para resolver este problema es la eliminación de los virus a través del uso de la biotecnología, el cual es un prerrequisito para la producción de material limpio para la siembra y para el intercambio del germoplasma. La limpieza viral se realiza por medio de cultivo de meristemo (Roca y Mroginski, 1991) o bien combinando esta metodología con otras técnicas como por ejemplo: la termoterapia, la cual consiste en colocar el tejido a una temperatura que por lo general es entre 35 a 45 °C, por períodos de tiempo que van de 20 a 30 días.

La obtención de 'semilla' limpia de plagas y enfermedades a través de la técnica de cultivos de tejidos, es una alternativa para combatir la degradación de la 'semilla'. A pesar de que el cultivo de meristemos o la termoterapia o la combinación de ambos pueden producir plantas libres de virus, se debe tener un sistema para evaluar la sanidad del material, una vez que fueron sometidos a las técnicas de limpieza. Uno de estos sistemas es el ELISA (del inglés: **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays**). Esta técnica se basa en el método "sándwich", que combina la acción de un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y de un anticuerpo detector, marcado con un sistema señalizador como es la peroxidasa, la sensibilidad que presenta este método es equivalente a la del aislamiento viral. Esta técnica es ampliamente utilizada en el diagnóstico viral para el camote (Oggema *et al* 2007, Ndunguru y Kapinga, 2007)

Otro sistema de detección es el uso de técnicas moleculares, como por ejemplo: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se puede dividir en tres fases. La primera consiste en la extracción y purificación del ADN del virus presente en la planta. La segunda fase, consiste en la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del virus mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por último se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR. Esta última fase se puede realizar por medios tradicionales, los cuales consisten en el uso de la electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Esta metodología se le conoce como PCR tradicional y tiene una duración de 24 h, mientras que una segunda opción es el uso de sondas específicas y tiene una duración de 2 h. Esta segunda opción es

lo que se conoce como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). En este caso, los procesos de amplificación y detección se hacen simultáneamente, en el mismo vial. Además, mediante detección por fluorescencia se puede determinar la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de la fluorescencia producida en las reacciones es proporcional a la cantidad de ADN formado (Costa, 2004). El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico viral en camote ha sido reportado por Fenby *et al* 1998, Valverde y Moreira, 2005, Parrella *et al* 2006, Nakhla *et al* 2008. Sin embargo, no hay reportes sobre el uso del PCR-TR en la detección viral en este cultivo.

1.1. Objetivos General

Producir plantas de camote libre de virus

1.2. Objetivos Específicos

Identificar los principales virus del camote en la zona de estudio

Desarrollar la metodología para la limpieza viral de las variedades de camote utilizadas en la región

Desarrollar la metodología para la micropropagación del camote libre de virus.

Establecer un banco de germoplasma con las principales variedades de camote utilizadas en la región Huetar Norte.

Evaluar el comportamiento del material de camote libre de virus en el campo.

2. METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del Estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH), ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR, SSC). El estudio viral se realizó en plantaciones de camote ubicadas en los cantones de San Carlos y San Ramón (Peñas Blancas), de la zona Huetar Norte.

2.2. Identificar los principales virus del camote en la zona de estudio

Primer meta fue realizar una descripción visual de los síntomas virales que afectan el camote.

Para lograr esta meta se visitaron plantaciones en los cantones de San Carlos y San Ramón. Se colectaron muestras de 25 parcelas en producción de ambos cantones. Cada lote fue ubicado geográficamente, con la ayuda de un sistema de posicionamiento global (GPS siglas en ingles). A cada lote se hizo una inspección visual.

Segundo meta fue la detección viral a través de las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA).

El método utilizado para la detección viral en camote fue el desarrollado por el Centro Internacional de la Papa (CIP), conocida como NCM-ELISA, el cual puede detectar los siguientes virus: el virus moteado plumoso (SPFMV, siglas en ingles), virus del moteado leve (SPMMV), el potivirus latente (SPLV), virus manchas cloróticas (SPCFV), virus del enanismo clorótico (SPCSV), el virus similar caulimo (SPCaLV), virus de leve precocidad (SPMSV), virus C-6 (C-6), virus G (SPVG) y el virus del mosaico de las cucurbitáceas (CMV). Para realizar este análisis se tomaron muestras de hojas de 1 cm de diámetro de tres hojas por plantación, seleccionadas al azar y colocadas en un tubo de 2,5 ml. Cada muestra se tomó dos veces. Posteriormente cada tubo fue identificado y colocado en cajas de aislamiento térmico con hielo, para su transporte al laboratorio, donde fueron almacenados a una temperatura de -30 °C hasta su procesamiento. El peso aproximado de la muestra fue de 400 mg.

El procedimiento para la detección viral utilizando el NCM-ELISA fue el siguiente: Las muestras congeladas fueron maceradas junto con 200 µl de amortiguador de extracción, en un microdesmembrador (Mikro-Dismembrator U, Sartorius) a 1200 r.p.m. por 1 minuto. Una vez macerado a cada muestra se le agregó 1500 µl más de amortiguador de extracción. En un orden definido, se dispensó 15 µl de muestra en cada una de las diez membranas previamente impregnadas con amortiguador TBS y marcadas con el nombre del respectivo anticuerpo a evaluar, y se dejaron secar por un periodo de 20 minutos. Una vez secas cada membrana fue sumergida en una solución de bloqueo por un periodo de 60 minutos, una vez transcurrido ese tiempo fueron lavadas rápidamente con amortiguador TBS e inmediatamente fueron sumergidas cada una en una solución amortiguadora conteniendo el respectivo anticuerpo para cada membrana, y se dejaron incubando toda la noche en un agitador orbital a 60 r.p.m. Finalizado este tiempo se descartó los anticuerpos y se realizó cuatro lavados de 3 minutos cada uno con amortiguador T-TBS, en constante agitación en un agitador orbital a 100 r.p.m. Inmediatamente después se sumergió cada membrana en 30 ml de solución de conjugado, y se dejó incubar por una hora, tras la cual se descartó la solución y se realizaron nuevamente cuatro lavados de 3 minutos cada uno con amortiguador T-TBS, en constante agitación en un agitador orbital a 100 r.p.m. Luego de los cuales se colocaron las membranas en toallas de papel para su secado. Para el revelado, se sumergió cada una de las membranas en 25 ml de solución de revelado, por 30 minutos, 60 minutos en el caso del SPCSV. Para detener la reacción se sumergió la membrana en agua y se lavó con agua

destilada dejando secar posteriormente.

Tercera meta, usar técnicas moleculares para el diagnóstico viral.

Con el objetivo de establecer una metodología para la detección del virus del moteado plumoso (SPFMV), el virus del enanismo clorótico (SPCSV) y el virus del enrollamiento de la hoja (SPLCV) en el cultivo del camote, mediante la técnica de RT-PCR y PCR se utilizó como base el protocolo establecido por Kokkinos y Clark (2006), estos investigadores diseñaron imprimadores y sondas TaqMan para la detección mediante PCR en tiempo real de cinco virus que afectan el camote, las secuencias de tres de esos imprimadores, utilizados en esta investigación se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Imprimadores utilizados en la detección de virus que afectan el camote (Kokkinos y Clark 2006).

Nombre del virus	Secuencia de los imprimadores 5' → 3'	Tamaño del producto de PCR	Gen	Ácido nucleico del genoma
SPFMV Virus del moteado plumoso del camote	GCCGATTTTAAACACCAGATGGA GGTTGCCCACTGTTATTTCTT	63	CP	ARN
SPCSV Virus del enanismo clorótico del camote.	CGAATCAACGGATCGGAATT CCACCGACTATTACATCACCACTCT	71	hHsp70	ARN
SPLCV Virus del enrollamiento de la hoja del camote.	GGCGCCTAAGTATGGCTGAA AACCGTATAAAGTATCTGGGAGTGTG	66	AC1	ADN

Durante la optimización del protocolo se analizó los imprimadores mediante el programa Pearlprimer, los imprimadores son específicos para cada uno de los virus, y no forman dímeros estables entre ellos.

Como primer paso, plantas de camote de cultivo *in vitro* que fueron testadas mediante NCM-ELISA para detectar la presencia del SPFMV y el SPCSV, fueron muestreadas y se les realizó extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) mediante la metodología propuesta por Gibbs y Mackenzie (1997). Para esto, se colocó 60 mg de tejido foliar en un tubo con un balín y 200 µl de buffer de extracción CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris HCl pH 8 0,1M y 0,5% de mercaptoetanol), el tubo se colocó en un molino de balines (Mikro-Dismembrator U, Sartorius) donde se maceró por 30 segundos a 2000 r.p.m., seguidamente se agregó 400 µl más de buffer de extracción CTAB y se incubó a 55°C por 30 minutos. Inmediatamente se añadió 400 µl de cloroformo:alcoholisomílico (24:1), y se centrifugó a 14500 rpm por 10 minutos. La fase superior se transfirió a un tubo

nuevo y se precipitó los ANT con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 1 volumen de isopropanol. Después de incubar a 4°C por 30 minutos, se centrifugó a 14500 rpm por 10 minutos, el precipitado de ANT se lavó con 1 ml de etanol 70%, luego de descartar el etanol y secado el precipitado se resuspendió los ANT en 50 µl de agua calidad PCR.

Seguidamente se realizó retrotranscripción de los ARNs presentes en la muestra, se prepararon reacciones de 10 µl conteniendo 1,25X de buffer de reacción de la retrotranscriptasa, 1 mM de dNTP's, 0,375 µM de uno de los imprimadores, 100 u de transcriptasa inversa (RevertAid™M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas) y 4 µl de ANT, la retrotranscripción se realizó a 42°C por 90 minutos seguido de 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. Para la amplificación de los ADNc se prepararon reacciones de 12,5 µl conteniendo 1X del buffer de la polimerasa (DreamTaq Buffer® Fermentas), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,3 µM de cada uno de los imprimadores, 1 U Taq Polimerasa (DreamTaq DNA Polymerase® Fermentas) y 2 µl de ADNc.

Para la detección del SPLCV se prepararon reacciones de 12,5 µl conteniendo 1X del buffer de la polimerasa (DreamTaq Buffer® Fermentas), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,3µM de cada uno de los imprimadores, 1 U Taq Polimerasa (DreamTaq DNA Polymerase® Fermentas) y 2 µl de ANT. No se contó con plantas que sirvieran como controles positivos para la detección de este virus. El perfil térmico utilizado para la realización del PCR se realizó en un termociclador Peltier Thermal Cycler (PTC-200), y consistió de 2 minutos de desnaturalización a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, por último 5 minutos de polimerización a 72°C. La separación de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en microchip utilizando el sistema automatizado MultiNA (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, se optó por este sistema por el pequeño tamaño de los productos de PCR esperados.

2.3. Desarrollar la metodología para la limpieza viral de las variedades de camote utilizadas en la región.

La meta de este objetivo fue limpiar el camote de los principales virus reportados en el país (SPFMV, SPCSV y SPLCV). Sin embargo, el Lab. Biotecnología contaba con una variedad introducida al país (Beauregard), la cual había dado positivo para los 10 diferentes virus que evalúa el NCM-ELISA. Se decidió evaluar la termoterapia y la extracción de meristemos para la limpieza viral. La metodología utilizada fue la colocación de meristemos de camote de aproximadamente 1 cm de largo en tubos de PCR de 200 µl previamente autoclavados. Posteriormente, los tubos conteniendo los explantes se colocaron en un termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 por cuatro, seis, ocho y diez horas a una temperatura de 40°C, para cada uno de los tiempos se colocaron diez explantes (Fig. 1). Las variables a medir fueron: porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de plantas libres de virus.



Fig. 1. Procedimiento utilizado para el tratamiento de termoterapia.

2.4. Desarrollar la metodología para la micropropagación del camote libre de virus

Para lograr este objetivo se evaluó la metodología desarrollada por Salas (2009), la cual consistió en el uso del medio Murashige & Skoog (MS) (1962) sin reguladores de crecimiento en la fase de establecimiento. Una vez que se determinó que el material se encontraba libre de virus, éste se subcultivó en el medio de Murashige & Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento, evaluándose la tasa de multiplicación (# de nudos por planta) de dos periodos de subcultivo a los 50 y 60 días. Posteriormente las vitroplantas fueron trasladadas a un sustrato autoclavado de tierra, compost, arena y fibra de coco en partes iguales, además antes de la siembra se regó la bandeja con una solución de Vitavax® a una concentración de 4g/l. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia

2.5. Banco germoplasma

La meta de este objetivo fue establecer un banco de germoplasma de los materiales utilizados en la zona de estudio. Una vez colectado los materiales estos fueron colocados en un banco de germoplasma para su limpieza y conservación. Para lograr esta meta, se colectó materiales de las plantaciones visitadas, los cuales se establecieron en el Laboratorio de Biotecnología.

2.6. Evaluar el comportamiento del material de camote libre de virus en el campo.

La meta de este objetivo fue evaluar agrónomicamente el comportamiento de las plantas libre de virus en el campo y comparar su comportamiento con las plantas provenientes de "semilla" convencional. Para realizar este estudio se propuso una tesis, para lo cual se contó con la colaboración del estudiante David Cambroner cuyo trabajo se denominó **"COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO E INCIDENCIA VIRAL ENTRE ESQUEJES DE CAMOTE (*Ipomoea batatas*) OBTENIDOS *IN VITRO* Y ESQUEJES PROVENIENTES DE PLANTACIONES COMERCIALES, EN LA REGION HUETAR NORTE"**.

3. RESULTADOS

3.1. Ubicación del Estudio

Este estudio se realizó en los distritos de Peñas Blancas del cantón de San Ramón y los de La Tigra, La Fortuna y Florencia del cantón de San Carlos. Estas zonas fueron las principales áreas de producción de camote del país durante el estudio. Se tomaron muestras de 25 parcelas, de las cuales 36% estuvieron ubicadas en el cantón de San Ramón, mientras que los 64% restantes se localizaron en el cantón de San Carlos (Cuadro 2). La producción de camote está concentrada en pequeños productores. De acuerdo a este estudio, el área promedio de siembra de camote fue 4671 m², la mínima fue de 100 m² y la máxima de 21000 m². El estudio abarcó un área sembrada de camote de 98100 m².

Cuadro 2. Número y localidad de las parcelas muestreadas.

Cantón	Distrito	Lugar	# parcelas
San Ramón	Peñas Blancas	San Isidro	6
San Ramón	Peñas Blancas	Chachagua	2
San Ramón	Peñas Blancas	El Abanico	1
San Carlos	La Tigra	La Tigra	2
San Carlos	La Tigra	El Futuro	5
San Carlos	Pital	Pital	1
San Carlos	La Fortuna	La Lucha	2
San Carlos	La Fortuna	Sonafruca	1
San Carlos	La Fortuna	La Perla	3
Total			25

3.2. Identificar los principales virus del camote en la zona de estudio

Resultados en Anexo 1. Propuesta borrador de artículo "Detección de virus en plantaciones de camote (*Ipomoea batatas* L.) en la Región Huetar Norte, Costa Rica"

3.3. Desarrollar la metodología para la limpieza viral de las variedades de camote utilizadas en la región.

En el cuadro 3 se presentan los resultados de los tratamientos de termoterapia sobre la sobrevivencia de los meristemas. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de exposición sobre el explante. El 100% de los meristemas sobrevivieron al tratamiento independientemente del tiempo de exposición, por lo tanto se seleccionó el tratamiento de 10 h a 40 °C para hacer un segundo experimento y evaluar su efectividad para inhibir los virus. Un total de 65 ápices fueron tratados con 40 °C por 10 h en cuatro repeticiones de aproximadamente 15 cada y posteriormente se les extrajo el meristemo apical (domo meristemático). De los 65 meristemas tratados, sobrevivieron fue de 24, el resto se murieron por problemas de contaminación por hongos o bacterias. Al final solo se pudieron evaluar 14 de los 65 iniciales debido a problemas de contaminación bacterial. Esta 14 plantas dieron negativo para SPFMV, SPMMV, SPLV, SPCFV SPMSV, SPCaLV y CMV. Un 21% dio positivo para el SPVG y in 7% para el SPCSV. Los datos de este estudio están por encima de lo que reporta la literatura; por ejemplo Rukarwa *et al* (2010) reportó que un 77% de las plantas inoculadas con los virus SPFMV y SPMMV estaban libres de ellos después de haber aplicado tratamientos de termoterapia y de extraer el meristemas. Los tratamientos utilizados por estos investigadores fueron exponiendo las vitroplantas a 32 C por 8 h en oscuridad y o bien a 36 C por 16 h en luz durante cuatro semanas. Sin embargo estos tratamientos de termoterapia no limpiaron las plantas del virus SPCSV.

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia de explantes expuestos a 40 C durante diferentes periodos.

Tiempo (horas)	Explantes (#)	Sobrevivencia (%)
4	10	100
6	10	100
8	10	100
10	10	100

El uso de la termoterapia para la inhibición de los virus por lo general se ha aplicado a plantas en cámaras de ambiente controlado o bien a vitroplantas en cuartos de crecimiento por periodos que van desde cuatro hasta ocho semanas CIP (1988) y Roca y Mroginski (1991). En este experimento innovó al desarrollar una metodología donde la temperatura se mantuvo constante y estable durante

todo el proceso, utilizando el termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200. Al mantener la temperatura estable y constante durante todo el periodo de exposición del tejido, el efecto puede ser más eficiente y probablemente explique los resultados obtenidos, principalmente con la eliminación del SPCSV. Sin embargo, se requiere hacer más evaluaciones para hacer de este sistema un método más eficiente para la eliminación de virus en las plantas.

3.4. Desarrollar la metodología para la micropropagación del camote libre de virus

Salas (2009) desarrolló la metodología para el establecimiento y multiplicación del camote criollo. Esta consistió en el uso del medio MS sin reguladores de crecimiento para el establecimiento de meristemas y para la fase de multiplicación. Por lo tanto, se utilizó este protocolo para el establecimiento y multiplicación de la variedad Beauregard.

Se establecieron 40 meristemas de camote en el medio MS sin reguladores de crecimiento, el 100% de los meristemas sobrevivieron y crecieron. Para definir la tasa de multiplicación, se tomaron 10 frascos con 4,5 plantas de camote por frasco y se dejaron por un periodo de 50 y 60 días. El cuadro 4 muestra los resultados obtenidos. De acuerdo a estos datos, la mejor tasa de multiplicación se obtuvo a los 50 días, con 6,53 explantes por planta. Si el material permanece más tiempo en el medio, la tasa de multiplicación fue 4,49 explantes por planta, reduciéndose un 45,4%. El método de propagación *in vitro* del camote es por medio de micro estacas, cada micro estaca contiene un nudo, el cual posee al menos una yema, la cual originará una nueva planta. Esta reducción en la tasa de multiplicación podría estar asociada al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, desacelerando la producción de biomasa y por ende del crecimiento de la planta. La planta *in vitro* es una planta heterótrofa, esta no puede sintetizar sus propios carbohidratos y depende de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo para producir biomasa y poder crecer. Conforme la planta crece y usa esos nutrientes, su contenido en el medio disminuye, afectando de esta forma su crecimiento (Hartmann y Kester 1983).

En la fase de aclimatización en invernadero de las vitroplantas, se evaluó el efecto del tamaño de la vitroplanta sobre la sobrevivencia de la planta en el invernadero. De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro 5, el 98,7% de las vitroplantas con un tamaño de 4 cm sobrevivieron a la fase de aclimatización, mientras que aquellas que tenían 7 cm de altura solo sobrevivieron un 38,3%. Las vitroplantas de 7 cm eran plantas con tallos delgados y alargados, con una gran cantidad de hojas, mientras que las vitroplantas de 4 cm de altura, tenían un tallo

grueso y pequeño. Estas características fenotípicas de ambos materiales pudieron influir en el resultado obtenido debido a que entre más grande es la vitroplanta, probablemente más transpiración y por lo tanto más susceptible a morir debido a problemas de deshidratación durante la aclimatización (Hartmann y Kester 1983).

Cuadro 4. Tasa de multiplicación del camote variedad Beauregard a los 50 y 60 días de haber sido establecidos

Periodo (días)	Tasa multiplicación	Desviación estándar
50	6,53	1,63
60	4,49	0,97

Las vitroplantas se caracterizan por tener los estomas abiertos debido a que ellas se encuentran en recipientes donde la humedad relativa es alrededor de 100%, por lo que no requieren controlar la apertura y cierre de estomas. Esto obliga que durante la aclimatización de cualquier planta *in vitro*, se requiera de ambientes con una alta humedad relativa y a través del tiempo se le va reduciendo la humedad relativa para que la planta inicie el proceso de control estomático e inicie el proceso autotrófico.

Cuadro 5. Efecto del tamaño del explante durante la aclimatización del camote en invernadero

Altura de vitroplanta (cm)	Vitroplantas (#)	Plantas aclimatizadas (#)	Sobrevivencia (%)
4	150	148	98,7
7	400	153	38,3

3.5. Banco germoplasma

En el cuadro 6 se presentan los datos de los diferentes materiales de camote encontrados durante el muestreo, su ubicación geográfica y características de color interno y externo. El 40% de los materiales corresponde al camote conocido como criollo, el cual es de color externo rosado y el color interno es amarillo. Se encuentra ampliamente distribuido en las zonas de estudio. Estos resultados probablemente se deben a que es el material más consumido por el mercado nacional. En segundo lugar se encuentra el camote guapileño con un

24%. Este material es utilizado para la exportación y mercado local. Sin embargo, existe una confusión entre los productores sobre ambos materiales, lo que para uno es criollo para otro es guapileño o le dan otro nombre. Se requiere trabajar a futuro con los descriptores para determinar las diferencias entre uno y el otro. Otros materiales utilizados por los productores fueron: camote zanahoria, camote Beauregard y camote blanco, con un 16%, 12% y 8%, respectivamente. Estos materiales fueron ubicados en la finca La Esmeralda para su reproducción y evaluación en un par de ocasiones. Sin embargo, debido a los problemas de robos que ha afectado la Sede, los materiales fueron dañados. Actualmente se tiene la colaboración de los agricultores que poseen los materiales para hacer las caracterizaciones fenotípicas y su introducción *in vitro*.

3.6. Evaluar el comportamiento del material de camote libre de virus en el campo.

Ver los resultados en Anexo 2. Tesis del Ing. Agrónomo David Cambroner denominada **"COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO E INCIDENCIA VIRAL ENTRE ESQUEJES DE CAMOTE (*Ipomoea batatas*) OBTENIDOS *IN VITRO* Y ESQUEJES PROVENIENTES DE PLANTACIONES COMERCIALES, EN LA REGION HUETAR NORTE"**.

Se evaluó la biomasa de hoja, tallo y raíz durante el ciclo de cultivo, así como el rendimiento a los 105 días después de la siembra y la incidencia viral a la siembra y a la cosecha en esquejes de material de camote que fueron obtenidos de material de campo (convencional) y esquejes obtenidos de vitroplantas libres de virus. Además se evaluó el efecto de la malla antiáfidos sobre el material *in vitro* para la obtención de semilla limpia en campo. La investigación se llevó a cabo en Finca La Esmeralda del Instituto Tecnológico de Costa Rica en San Carlos. Para las variables de hoja, tallo y raíz las plantas procedentes de esquejes del material *in vitro* superó estadísticamente en cantidad de peso seco al material de campo. La variable de rendimiento fue evaluada en dos categorías, mercado local e industria (pelado). El material *in vitro* superó estadísticamente en rendimiento al material convencional al obtener 34,24 y 43,31 ton/ha respectivamente contra 22,89 y 27,43 ton/ha del material convencional en el mismo orden. La incidencia viral fue evaluada mediante la prueba NCM-ELISA resultando que ambos materiales no presentaron infección viral mientras que el efecto de la malla antiáfidos sobre el material *in vitro* no fue el esperado por dificultades de manejo al presentarse una competencia con malezas y al sufrir un ataque por *Spodoptera* sp. Se concluye que el uso de esquejes de vitroplantas libres de virus produce plantas con un mejor crecimiento y con un mayor rendimiento que el uso de esquejes de plantaciones convencionales.

Palabras Clave: Camote, esquejes, crecimiento, rendimiento, convencional, *in vitro*.

Cuadro 6. Ubicación geográfica de cada uno de los materiales colectados y su descripción del color externo e interno del camote

Cantón	Distrito	Localidad	Ubicación geográfica	Nombre	Color externo	Color interno pulpa
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 27'09,4''N 84° 38'20,7''O	Blanco	Amarillo	Crema
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 27'09,4''N 84° 38'20,7''O	Criollo	Rosado	Amarillo
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 6'35,8''N 84° 38'12,6''O	Blanco	Amarillo	Crema
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 6'35,8''N 84° 38'12,6''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 6'35,8''N 84° 38'12,6''O	Zanahoria	Rosado	Anaranjado
San Ramón	Peñas Blancas	Jaurí	10° 6'35,8''N 84° 38'12,6''O	Guapileño	Rosado	amarillo
San Ramón	Peñas Blancas	Chachagua	10° 24'45,0''N 84° 36'19,2''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Ramón	Peñas Blancas	Chachagua	10° 24'36,7''N 84° 35'31,4''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Ramón	Peñas Blancas	El Abanico	10° 25'47,7''N 84° 34'30,0''O	Guapileño	Morado	amarillo
San Carlos	La Tigra	El Futuro	10° 2'11,2''N 84° 32'12,9''O	Criollo	Rosado	blanca
San Carlos	La Tigra	El Futuro	10° 2'11,2''N 84° 32'12,9''O	Zanahoria	Rosado	Anaranjado
San Carlos	La Tigra	El Futuro	10° 21'56,8''N 84° 32'13,8''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Carlos	La Tigra	El Futuro	10° 21'59,5''N 84° 32'26,0''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Carlos	La Tigra	El Futuro	10° 21'27,3''N 84° 32'43,4''O	Zanahoria	Rosado	Anaranjado
San Carlos	La Tigra	La Tigra	10° 21'55,8''N 84° 35'09,7''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Carlos	La Tigra	La Tigra	10° 21'55,8''N 84° 35'09,7''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Carlos	Pital	Pital		Beauregard	Café	Anaranjado
San Carlos	La Fortuna	La Lucha	10° 21'34,7''N 84° 34'47,3''O	Zanahoria	Rosado	Anaranjado
San Carlos	La Fortuna	La Lucha	10° 21'09,1''N 84° 34'16,6''O	Criollo	Rosado	amarillo
San Carlos	La Fortuna	SonaFruca	10° 27'14,0''N 84° 36'04,3''O	Guapileño	Rosado	amarillo
San Carlos	La Fortuna	La Perla	10° 27'17,1''N 84° 32'07,0''O	Guapileño	Morado	amarillo
San Carlos	La Fortuna	La Perla	10° 27'17,1''N 84° 32'07,0''O	Guapileño	Morado	amarillo
San Carlos	La Fortuna	La Perla	10° 27'29,5''N 84° 32'21,5''O	Guapileño	Morado	amarillo
San Carlos	Florencia	Sta Clara	10° 21'49,6''N 84° 30'29,7''O	Beauregard	Café	Anaranjado
San Carlos	Florencia	Sta Clara	10° 21'49,6''N 84° 30'29,7''O	Beauregard	Café	Anaranjado

4. CONCLUSIONES

1. Los principales virus detectados en la zona de estudio fueron el virus moteado plumoso del camote (SPFMV) y el virus de la mancha clorótica (SPCFV).
2. El uso de técnicas moleculares para la detección de virus, como la electroforesis en chip permitió distinguir entre los virus analizados a pesar de los bajos pesos moleculares de los productos de PCR.
3. La combinación de termoterapia (40 C por 10 h) y el cultivo de meristemas permitió producir plantas libres de virus en un 100% de SPFMV y SPCFV para la variedad Beauregard.
4. La metodología para el establecimiento *in vitro* del camote fue el uso de un MS sin reguladores para las fases de establecimiento y multiplicación, con ciclos multiplicación de 50 días.
5. Se encontraron cinco diferentes materiales de camote, aunque existe confusión entre el camote criollo y el guapileño.
6. El material libre de virus producido *in vitro* tuvo un mejor crecimiento y producción que material provenientes de plantas de campo

5. RECOMENDACIONES

1. Hacer más estudios para mejorar la detección viral por medio de las técnicas moleculares
2. Se deben hacer más evaluaciones para determinar la eficiencia de la metodología de termoterapia utilizada en esta investigación
3. Se deben caracterizar los materiales con los descriptores utilizados por IPGRI para la debida identificación

6. RECOMENDACIONES

Se agradece la valiosa colaboración del Ing. Orlando Hernández M. de la Agencia del MAG, en La Fortuna, en la toma de datos sobre virus en camote en su área de influencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(5):299-305
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1988. Mejoramiento de la Batata (*Ipomoea batata*) en Latinoamérica. Memorias sobre el "Seminario sobre el Mejoramiento de la Batata (*Ipomoea batata*) en Latinoamérica. 277 p
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. FAOSTAT. Consultado el 1 abril del 2009. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Fenby N.S., Seal S., Gibson R.W., Foster G.D. 1998. RNA extraction from virus-diseased sweet potato for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Molecular Biotechnology*. 10 (2): 187.190
- Hartmann H.T., Kester D.E. 1983. *Plant Propagation*. Ed Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. USA. 726 p
- Kokkinos, CD; Clark, CA. 2006. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. *Plant Disease* 90: 783-788.
- León J. 1987 *Botánica de los cultivos tropicales*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007. Informe de Censo Raíces Tropicales, Piña, Plátano, Papaya y Mamón Chino.
- Murashige, T. F., Skoog F. 1962 . A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473 - 497.
- Nakhla M. K., Owens K. J, Li W., Levy L. 2008. Development of real-time PCR for the detection of exotic potyviruses infecting imported plant germplasm . *Phytopathology* 98:S111. Consultado el 14 abril 2009. Disponible en: <http://www.apsnet.org/meetings/2008/abstracts/a08ma574.htm>
- Ndunguru J., Kapinga R. 2007 Viruses and virus-like diseases affecting sweet potato subsistence farming in southern Tanzania. *African Journal of Agricultural Research*. 2 (5): 232-239
- Oggema J.N., Kinyua M.G., Ouma J.P., Owuochi J.O. 2007. Agronomic performance of locally adapted sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) cultivars derived from tissue culture regenerated plants. *African Journal of Biotechnology*. 6 (12): 1418-1425.

- Parrella G., De Stradis A., Giorgini M. 2006. *Sweet potato feathery mottle virus* is the casual agent of Sweet Potato Virus Disease (SPVD) in Italy. *Plant Pathology*. 55(6):818
- Roca W. M., Mroginski L.A. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro de Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 p
- Rukarwa R.J., Mashingaidze A.B., Kyamanywa S. y Mukasa S.B. 2010. Detec and elimination of sweetpotato viruses. *African Crop Science Journal* 18(1). 223 - 233
- Salas M. 2009. *Propagación clonal in vitro de camote (ipomoea batatas)*. Tesis de Práctica de especialidad, San Carlos: CR. ITCR, Escuela de Agronomía. 66 p.
- Valverde R., Moreira M. A. 2005 Identificación de virus en el cultivo de camote (*Ipomoea batatas* L.) en Costa Rica. *Rev. Agr Trop*. 35:1-8.
- Vásquez A., León C. 2006. *Producción y uso de la batata (Ipomoea batatas, Lam); estrategias de alimentación animal – batata forrajera*. Instituto Superior de Agricultura, ISA. Santiago de los Caballeros, República Dominicana. Consultada el 25 de marzo del 2009. Disponible en: <http://inrm.cip.cgiar.org/home/publicat/070batfor.pdf>

ANEXO I

Título: Detección de virus en plantaciones de camote (*Ipomoea batatas L.*) en la Región Huetar Norte, Costa Rica.

Título resumido. Detección de virus en camote en la Región Huetar Norte.

Autores: Ingrid Varela Benavides¹, Wayner Montero Carmona², Sergio Torres Portuguez³,

¹ Laboratorio de Nematología, Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sostenible para el Trópico Húmedo. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. Apartado 159-7050, Florencia, Alajuela. Tel: (506) 2401-3124, invarela@itcr.ac.cr.

² Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales, Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sostenible para el Trópico Húmedo, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Apartado 159-7050, Florencia, Alajuela. Tel: (506) 2401-3146, wamc.biotec@gmail.com

³ Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sostenible para el Trópico Húmedo, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Apartado 159-7050, Florencia, Alajuela. Tel: (506) 2401-3134, cidasth@gmail.com

Resumen.

Detección de virus en plantaciones de camote (*Ipomoea batatas L.*) en la Región Huetar Norte, Costa Rica. Las enfermedades virales son la patología más influyente en la disminución del rendimiento en las plantaciones de camote, su detección temprana es la estrategia de control más eficiente. Por esta razón se investigó, por primera vez, la presencia de enfermedades virales del camote en las plantaciones de la Región Huetar Norte de Costa Rica. Para tal fin muestras de tejido foliar de camote fueron colectadas en 15 sistemas productivos y una empacadora de tubérculos. Inicialmente las muestras fueron analizadas para la detección de virus mediante ELISA en membrana de nitrocelulosa, utilizando el kit de detección NCM-ELISA for sweetpotato viruses detection, desarrollado por el CIP para la detección de diez diferentes virus que afectan al camote. Posteriormente se confirmaron los resultados mediante RT-PCR y electroforesis

en chip. Se detectó cuatro muestras infectadas con el SPFMV, todas las muestras infectadas habían sido colectadas en el cantón de San Carlos. No se detectaron muestras infectadas con otros virus. El uso del kit de detección por medio de NCM-ELISA permitió evaluar rápidamente la presencia de diez diferentes virus que afectan al camote en una gran cantidad de muestras. Esta técnica tiene potencial en exploraciones de la presencia de virus en áreas camoterías, ya que permite procesar muchas muestras en poco tiempo, y podría utilizarse en el campo. La detección mediante RT-PCR, técnica más sensible, permitió confirmar los resultados.

Palabras clave: NCM-ELISA, RT-PCR, electroforesis en chip, virus del moteado plumoso, virus del enanismo clorótico.

Abstract

Detection of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) viruses in the Región Huetar Norte, Costa Rica. Viral diseases are the most influential pathology in the reduction of yield in sweet potato commercial fields; early detection is the most efficient control strategy. This survey investigates the viral diseases in sweet potato fields in the Región Huetar Norte, Costa Rica. For reach this objective, foliage samples were collected from 15 commercial fields and a packing plant. First, the samples were analyzed by nitrocellulose membrane ELISA, using the NCM-ELISA for sweet potato virus detection kit, developed by the International Potato Center, to detect ten different viruses affecting sweet potato. Then the results were confirmed by RT-PCR and chip electrophoresis. Four samples were found infected with SPFMV, all infected samples had been collected in San Carlos. The other

viruses evaluated were not detected. The use of NCM-ELISA kit allowed quickly assess the presence of ten different viruses in a large number of samples. This technique has potential use in the scan of viruses incidence in areas where sweet potato is cultivated. NCM-ELISA allows testing many samples in a short time, and can be used in the field. RT-PCR it's a more sensitive technique that allows to confirm the obtained results.

Key words: NCM-ELISA, RT-PCR, chip electrophoresis, sweet potato feathery mottle virus, sweet potato chlorotic stunt virus.

Introducción.

El camote (*Ipomoea batatas*) es una raíz modificada perteneciente a la familia de las convolvuláceas y es considerada uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, con una producción anual cercana a los 100 millones de toneladas métricas (FAO 2011).

En Costa Rica, el camote se cultiva principalmente en las regiones Huetar Norte, Huetar Atlántica y en el Valle Central. En la Región Huetar Norte hay 118 productores, con un área de 137.9 ha de camote, siendo el cantón de San Carlos el que tiene la mayor extensión (64.2 Ha), otros cantones con áreas importantes son San Ramón y Los Chiles, 27 y 23 ha respectivamente (MAG 2007). El rendimiento promedio del cultivo aumentó en 3 t/ha del 2010 al 2011, pasando la producción de 360 a 971 toneladas métricas (MAG 2012).

El camote es una planta muy susceptible a las enfermedades virales, alrededor de 20 virus distintos se han aislado, descrito y caracterizado para el

camote (Valverde *et al.* 2007). La disminución en el rendimiento a causa de las infecciones provocadas por virus puede alcanzar más del 50% (Clark y Hoy 2006).

La patología más importante provocada por virus, es la enfermedad viral del camote (SPVD) causada por la interacción sinérgica del virus del moteado plumoso (SPFMV) y el virus del enanismo clorótico (SPCSV) que causa reducciones en el rendimiento de más de un 90% y es considerada la enfermedad más importante en las plantaciones de camote en África (Gutiérrez *et al.* 2003, Aritua *et al.* 2005, Oggema *et al.* 2007).

Además, en el Centro Internacional de la Papa (CIP) se considera a los virus del camote como la principal restricción en el esfuerzo por distribuir el germoplasma y mejorar el cultivo en las áreas productoras (Salazar y Fuentes 2000).

La principal estrategia para mejorar el control de las enfermedades virales en camote es la detección de los virus tempranamente en las plantaciones, y en el material para propagación. Los métodos para detección incluyen pruebas serológicas (ELISA) y moleculares PCR y RT-PCR (Wester *et al.* 2004, Lotrakul *et al.* 2003).

En Costa Rica, Valverde y Moreira (2004) hicieron el primer estudio de incidencia de las enfermedades virales en plantaciones comerciales de camote en Alajuela, Heredia, Cartago y Limón. En las localidades de El Coyol de Alajuela y Santa Bárbara de Heredia el porcentaje de plantas infectadas alcanzó un 90% en algunas regiones, el virus más frecuentemente detectado fue el SPFMV, seguido por el SPCSV y el virus del enrollamiento de la hoja (SPLCV). Este estudio no incluyó plantaciones de la Región Huetar Norte.

El objetivo de esta investigación fue explorar la presencia de enfermedades virales del camote en las plantaciones de la Región Huetar Norte.

Metodología.

Muestras de tejido foliar de camote fueron colectadas en 25 plantaciones, ubicados en los cantones de San Carlos y San Ramón, en la Región Huetar Norte del país (cuadro 1).

Cuadro 1: Ubicación geográfica y número de plantaciones muestreadas para la identificación de los virus en el cultivo del camote.

Localidad	Coordenadas	Número de plantaciones
<u>San Isidro de Peñas Blancas,</u>		
<u>San Ramón</u>		
Jaurí	10°27'09,4"N y 84°38'20,7" O	2
Jaurí	10°26'35,8"N y 84°38'12,6" O	4
Chachagua	10°24'45,0"N y 84°36'19,2" O	1
Chachagua	10°24'36,7"N y 84°35'31,4" O	1
Asentamiento El Abanico	10°25'47,7"N y 84°34'30,0" O	1
<u>San Carlos</u>		
Sonafluca, La Fortuna	10°27'14,0"N y 84°36'04,3" O	1
Asentamiento El Futuro, La Tigra	10°22'11,2"N y 84°32'12,9" O	2
Asentamiento El Futuro, La Tigra	10°21'56,8"N y 84°32'13,8" O	1
Asentamiento El Futuro, La Tigra	10°21'59,5"N y 84°32'26,0" O	1
Asentamiento El Futuro, La Tigra	10°21'27,3"N y 84°32'43,4" O	1
La Lucha, La Tigra	10°21'34,7"N y 84°34'47,3" O	1
La Lucha, La Tigra	10°21'09,1"N y 84°34'16,6" O	1
La Lucha, La Tigra	10°21'55,8"N y	3

	84°35'09,7'' O	
La Perla, La Fortuna	10°27'17,1''N y	2
	84°32'07,0'' O	
La Perla, La Fortuna	10°27'29,5''N y	1
	84°32'21,5'' O	
Santa Clara, Florencia	10°21'49,6''N y	2
	84°30'29,7'' O	

Se tomaron muestras a plantas al azar. Las muestras fueron trasladadas en cajas de aislamiento térmico con hielo a las instalaciones de los laboratorios de Biotecnología de Cultivos Tropicales del Centro de Investigación y Desarrollo para la Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo (CIDASTH) y de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias y Letras, ambos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR, SSC).

Una vez en el laboratorio, las muestras se colocaron en congelación a una temperatura de -30°C hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron tomadas por duplicado, el peso aproximado de cada una fue de 400 mg.

Inicialmente las muestras fueron analizadas para la detección de virus mediante ELISA en membrana de nitrocelulosa, utilizando el kit de detección: NCM-ELISA for sweetpotato viruses detection, desarrollado por el CIP, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit detecta 13 diferentes virus que afectan al camote, se listan por sus nombres en inglés: sweet potato feathery mottle virus, sweet potato mild mottle virus, sweet potato latent virus, sweet potato chlorotic flecks virus, sweet potato mild speckling virus, C-6 virus, sweet potato chlorotic stunt virus, sweet potato caulimo-like virus, sweet potato virus G y cucumber mosaic virus.

Posteriormente a los duplicados de las muestras se les realizó extracción

de ácidos nucleicos totales (ANT) 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 0,1M y 0,5% de mercaptoetanol) con un molino de balines (Mikro-Dismembrator U, Sartorius). Después de incubar a 55°C por 30 minutos se separó las proteínas de los ANT mediante cloroformo:alcoholisomílico (24:1), y centrifugado. Para precipitar los ANT se utilizó acetato de amonio 7,5 M e isopropanol. El precipitado de ANT se limpió con etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de agua calidad PCR.

Para eliminar posibles compuestos fenólicos y polisacáridos se realizó una purificación extra de los ANT con el kit para purificación de ADN Nucleo Spin Gel and PCR clean up de Macherey Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fenby *et al.* 1998), los ANT fueron eluidos en 30 µl de agua.

Para la detección mediante RT-PCR se utilizaron los iniciadores de PCR diseñados por Kokkinos y Clark (2006), para la detección de virus del camote mediante PCR en tiempo real. Los iniciadores para el SPMV (5'GCCGATTTTAACACCAGATGGA 3' y 5'GGTTGCCCACTGTTATTTTCCTT 3') amplifican un fragmento de 63 pb del gen homólogo de la proteína de la cápside CP y los iniciadores para el SPCSV (5' CGAATCAACGGATCGGAATT 3' y 5' CCACCGACTATTACATCACCACTCT 3') amplifican un fragmento de 71 pb del gen homólogo de la proteína de choque calórico hHsp70.

Para la retrotranscripción de los ARNs presentes en la muestra, se prepararon reacciones de 10 µl conteniendo 1X de buffer de reacción de la retrotranscriptasa, 10U de RiboLock inhibidor de la ARNasa, 1 mM de dNTP`s, 0,5 µM de uno de los imprimadores, 100 u de transcriptasa inversa (RevertAid H

Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Thermo Scientific) y 2 µl de ANT, la retrotranscripción se realizó a 42°C por 60 minutos seguido de 5 minutos a 70°C.

Para la amplificación de los ADNc se prepararon reacciones de 12,5 µl conteniendo 1X del buffer de la polimerasa (DreamTaq Buffer Fermentas), 2 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP's, 0,3 µM de cada uno de los imprimadores, 1 U Taq Polimerasa (DreamTaq DNA Polymerase Fermentas) y 2 µl de ADNc.

El perfil térmico se realizó en un termociclador Peltier Thermal Cycler (PTC-200), y consistió de 2 minutos de desnaturalización a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, por último 5 minutos de polimerización a 72°C.

La separación de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en microchip utilizando el sistema automatizado MultiNA (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Resultados.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el NCM-ELISA, se detectó que el 16% de las muestras con el virus moteado plumoso (SPFMV) y un 8,6% con el virus de las manchas cloróticas (SPCFV). La presencia del virus moteado plumoso se dio en los distritos de La Tigra y La Fortuna, mientras que el virus de las manchas cloróticas solo se presentó en La Tigra. El 100% de las parcelas con virus están localizadas en el cantón de San Carlos. Los síntomas observados fueron moteado clorótico y corrugamiento de las hojas (figura 1).

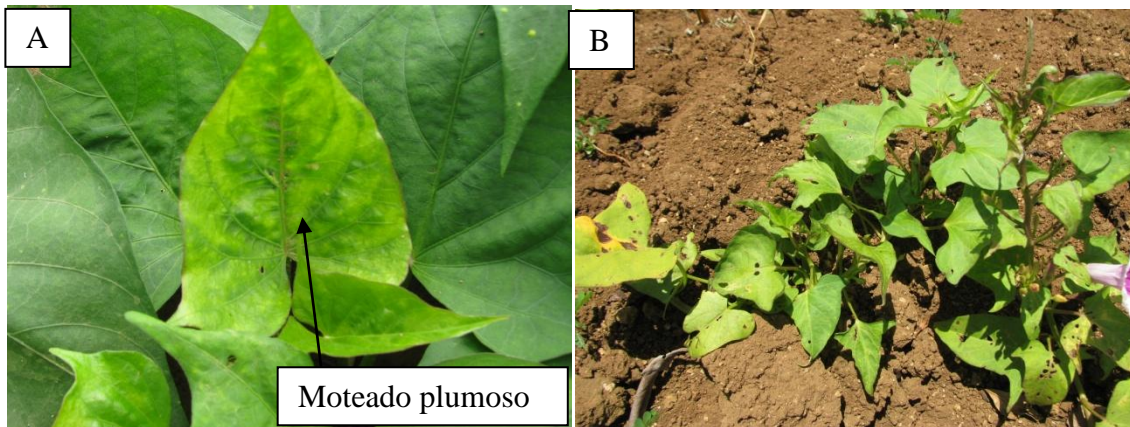


Fig. 1 Síntomas del virus del moteado plumoso del camote (SPFMV) en dos variedades. A. Guapileño y B) Criollo en el distrito de La Fortuna de San Carlos

Se detectó cuatro muestras infectadas con el SPFMV mediante NCM-ELISA (cuadro 2), en tres de ellas se había observado síntomas de infección viral, todas las muestras infectadas se habían colectado en el cantón de San Carlos.

Cuadro 2: Ubicación y síntomas observados en muestras infectadas con el SPFMV.

Muestra	Coordenadas	Lugar	síntomas
4 (A4)	10°27'14,0''N 84°36'04,3'' O	Zona Fluca, Fortuna	sin síntomas evidentes
32 (C2)	10°21'09,1''N 84°34'16,6'' O	La Lucha, La Tigra	corrugamiento de las hojas
34 (C4)	10°27'17,1''N 84°32'07,0'' O	La Perla, La Fortuna	moteado y corrugamiento de las hojas
40 (D1)	10°27'29,5''N 84°32'21,5'' O	La Perla, La Fortuna	moteado y corrugamiento de las hojas

En la figura 2 se observa las reacciones positivas en la membrana de nitrocelulosa cómo puntos oscuros. Los otros virus evaluados no fueron detectados en ninguna de las muestras (no se muestran las imágenes).

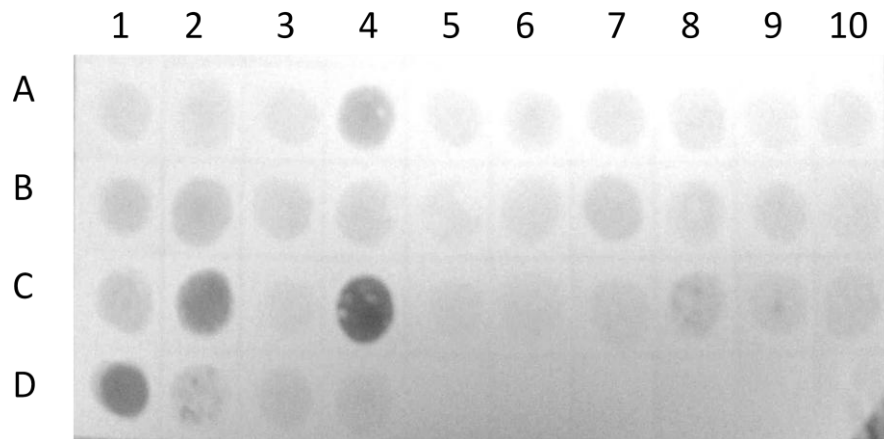


Figura 2: Membrana de nitrocelulosa, mostrando los resultados de NCM-ELISA para detección de SPFMV en muestras de camote de la Región Huetar Norte, las muestras positivas aparecen como puntos oscuros en la membrana.

Los resultados del análisis de NCM-ELISA fueron confirmados mediante RT-PCR y electroforesis en chip. En la figura 3, se observa la amplificación del SPFMV en dos muestras infectadas con el virus (muestra 4 y muestra 32), mientras que en una muestra que había resultado negativa no se observa amplificación (muestra 3). El producto esperado en este caso es de 63 ± 6 pb.

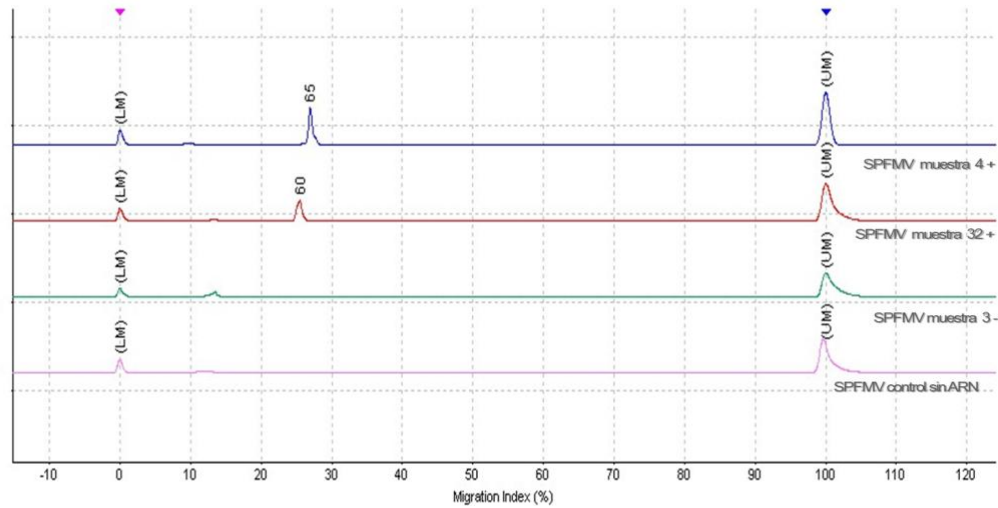


Figura 3: Electrofenograma de la amplificación de SPFMV en muestras de camote colectadas en la Región Huetar Norte, peso molecular en pb.

El SPCSV no fue detectado en las muestras colectadas, en la figura 4 se muestra la amplificación en los controles positivos, el producto esperado es de 71 ± 6 pb, la concentración obtenida del producto de PCR fue baja.

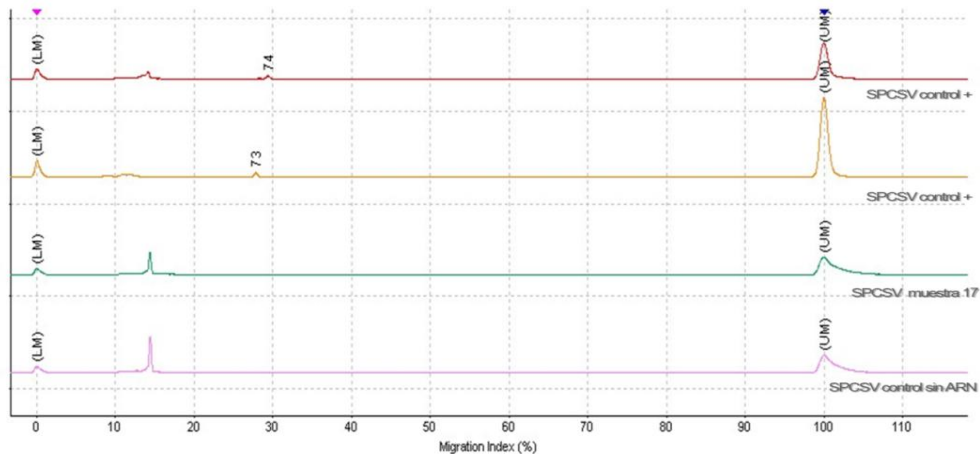


Figura 4: Electrofenograma de la amplificación de SPCSV en muestras de camote infectadas con el virus, peso molecular en pb.

Discusión.

La incidencia detectada en las plantaciones camoterías en San Carlos es baja, si se compara con la alta incidencia reportada por Valverde y Moreira (2004) para la Región Central del país. Esto puede deberse a que el Valle Central ha sido una zona tradicional de producción de este cultivo, mientras que la zona de San Carlos es un área de producción relativamente nueva.

Sin embargo, la detección de muestras infectadas y la observación de síntomas, en las plantaciones evidencian la necesidad de realizar monitoreo de las plantaciones, con el fin de evitar que se ocurra una alta incidencia en el futuro.

El uso del kit de detección por medio de NCM-ELISA permitió evaluar rápidamente la presencia de diez diferentes virus que afectan al camote en una gran cantidad de muestras. Esta técnica tiene potencial en exploraciones de la presencia de virus en áreas camoterías, ya que es una opción económica y fácil, que permite procesar muchas muestras en poco tiempo, y que podría utilizarse en el campo.

Sin embargo, la sensibilidad máxima de detección del ELISA es del orden de 1ng/ml, por lo que la detección se dificulta en plantas con poca carga viral, o en órganos en los que la concentración de virus es baja, como en los tubérculos (INIA 2010).

El desarrollo de protocolos que utilicen para la detección técnicas de PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real, complementan los ensayos de ELISA mejorando la detección en semilla certificada, materiales en los bancos de germoplasma y en los ensayos de métodos de limpieza viral. Mediante PCR y RT-PCR se pueden

detectar picogramos o nanogramos de virus en material vegetal, mientras que mediante PCR en tiempo real se puede cuantificar la carga viral en el mismo (INIA 2010).

El método propuesto por Fenby y colaboradores (1998) fue útil durante la detección de los virus mediante RT-PCR, la limpieza de los ANT de compuestos fenólicos y polisacáridos mediante una columna, permitió detectar los virus directamente del material de campo, sin tener que utilizar *I. setosa* como intermediario en el procedimiento, otros procedimientos se probaron para simplificar aún más el procedimiento (no se muestran los resultados). La simplificación de la detección mediante PCR es importante para facilitar su uso en programa de monitoreo.

El uso de electroforesis en chip permitió distinguir entre los virus analizados a pesar de los bajos pesos moleculares de los productos de PCR, y de la similitud de sus tamaños, el uso de esta herramienta en la detección viral es útil, especialmente si se requiere secuencias de los productos obtenidos

Bibliografía

Aritua, V; Gibson, R; Vetten, J. 2005. Serological analysis of sweetpotatoes affected by sweetpotato virus disease in East Africa . In: Anderson, PK; Morales FJ. ed. Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). CIAT Publication no 341. Cali, CO. p. 83-88.

Clark, CA; Hoy, MW. 2006. Effects of common viruses on yield and quality of

- Beauregard sweetpotato in Louisiana. *Plant Disease* 90: 83-88.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. FAOSTAT. Consultado. 3 jun 2013. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fenby, NS; Seal, S; Gibson, RW; Foster, GD. 1998. RNA extraction from virus-diseased sweet potato for reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Molecular Biotechnology* 10(2): 187-190.
- Gutierrez, DL; Fuentes, S; Salazar, LF. 2003. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweetpotato yield in Peru. *Plant Disease* 87: 297- 302.
- 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. Departamento de Protección Vegetal INIA-Madrid. 124 p.
- Kokkinos, CD; Clark, CA. 2006. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. *Plant Disease* 90: 783-788.
- Lotrakul, P; Valverde, RA; Clark, CA; Fauquet, CM. 2003. Properties of a Begomovirus isolated from sweetpotato infected with Sweet potato leaf curl virus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 128-136.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007. Informe de Censo Raíces Tropicales, Piña, Plátano, Papaya y Mamón Chino. 64 p.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2012. Raíces tropicales aumentan productividad. *NotiMAG*. 3 Junio 2012. Consultado. 12 jun 2013. Disponible en <http://prensamag.blogspot.com/2012/06/raices-tropicales-aumentan.html>
- Oggema, JN; Kinyua, MG; Ouma JP; Owuoche, JO. 2007. *Agronomic*

- performance of locally adapted sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) cultivars derived from tissue culture regenerated plants. African Journal of Biotechnology 6(12): 1418-1425.
- Salazar, LF; Fuentes, S. 2000. Current knowledge on major virus diseases on sweet potatoes. In: Nakasawa, Y; Ishiguro. ed. International Workshop Sweetpotato on Cultivar Decline Study. Miyakonojo, Japan. p. 14-19.
- Valverde, R; Moreira, MA. 2004. Identificación de virus en el cultivo de camote (*Ipomoea batatas* L.) en Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 15(1):1-7.
- Valverde, RA; Clark, CA; Valkonen, JPT. 2007. Viruses and Virus Disease Complexes of Sweetpotato. Plant Viruses 1: 116-126.
- Webster, CG; Wylie, SJ; Jones, MGK. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens . Current Science 86 (12): 1604-1607.

ANEXO II

COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO E INCIDENCIA VIRAL ENTRE ESQUEJES DE CAMOTE (*Ipomoea batatas*) OBTENIDOS *IN VITRO* Y ESQUEJES PROVENIENTES DE PLANTACIONES COMERCIALES, EN LA REGION HUETAR NORTE.

DAVID CAMBRONERO HERRERA

Trabajo de Tesis presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**