



Evaluación de la germinación de accesiones del Banco de Germoplasma de Quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) del Estado Plurinacional de Bolivia

Carolina Alanoca Quispe^{1*}, Delma Guzman¹, Soledad Lutino², Edwin Iquize Villca¹

¹Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, Av. Blanco Galindo Km 5.5, Casilla 832, Cochabamba, Bolivia

²Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, Av. Busch 1370, Casilla 4793, La Paz, Bolivia

*Autor para correspondencia: carol_aqc@hotmail.com

Resumen

Bolivia es un país rico en cuanto a la variabilidad genética en el cultivo de quinua, actualmente se tienen 3104 accesiones conservadas en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Toralapa procedentes de varios países, de las cuales el 75% son originarios de Bolivia. El año 2010 estas accesiones fueron transferidas al INIAF sin datos reales del porcentaje de germinación de cada accesión, desconociendo la viabilidad de este germoplasma, datos muy importantes para la conservación ex situ del material. En el presente trabajo se realizó el análisis de 2675 accesiones del cultivo de quinua para determinar el porcentaje de germinación, en laboratorios de análisis de calidad de semillas del INIAF, para planificar el refrescamiento y preservar el germoplasma. Estas pruebas se iniciaron a fines del año 2010, concluyéndose en el 2012 en los laboratorios de semilla del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal INIAF, según Reglas ISTA.

Se encontró que el 71.6% de las accesiones evaluadas presentaron una germinación menor o igual al 80% y un 28.4% solamente presentaron una germinación mayor al 80%. Por lo tanto se requiere refrescar mayor cantidad de accesiones conservadas en el Banco de Germoplasma.

Palabras claves: Banco de germoplasma, accesión, quinua, viabilidad, germinación

Abstract

Bolivia is a very rich country regarding genetic variability in quinoa. At present 3104 accessions are conserved in the Germplasm Bank at Toralapa Experimental Station from various countries and of which 75% are originally from Bolivia. On year 2010 these accessions were transferred to INIAF without data about the germination percentage each accession, therefore without information on the viability of this material. This is very important and necessary information for the ex situ conservation of the material. In the present study the analysis of 2675 accessions of quinoa in order to determine the germination percentage was performed in the Seed Analysis Laboratory of INIAF. Seed tests were started in 2010 and finished in 2012. It was found that 71.6% of the evaluated accessions had a germination percentage equal or inferior to 80% and that 28.4% presented a germination rate superior to 80%. It was concluded that the regeneration of the majority of the material of the Germplasm Bank is required.

Keywords: Germplasm Bank, accession, quinoa, viability, germination



Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es una especie nativa de la Región Andina, que se comparte entre Bolivia, Perú y Ecuador. En esta región también se encuentra la mayor diversidad de quinuas cultivadas y silvestres, la cual está relacionada con la diversidad agroecológica.

Este cultivo ha sido el sustento principal de los primeros pobladores andinos y también lo es para los agricultores que en la actualidad viven en el Altiplano Centro, Norte y Sur de Bolivia (Tapia, 1979). Adicionalmente, en la actualidad es un producto de gran interés para la alimentación humana por su alto contenido y calidad de proteínas, vitaminas y minerales. Es muy atractivo para el mercado internacional, cuya demanda se ha incrementado significativamente en los últimos años, lo cual demuestra la importancia económica de este cultivo para Bolivia, que es el principal país productor y exportador de quinua a nivel mundial.

Bolivia cuenta con más de 3000 accesiones de quinua que fueron recolectadas a partir de la década de 1960, estas accesiones poseen amplia variabilidad genética: algunas son precoces y otras tardías, existen diversos colores, formas y tamaños de semilla. Además, las accesiones bolivianas fueron recolectadas en regiones distribuidas a lo largo de la meseta del altiplano y valles interandinos de Bolivia, con características peculiares de cultivo, uso y transformación.

La conservación de estos Recursos Genéticos se realiza en condiciones *ex situ* y en forma de semilla en la Estación Experimental de Toralapa (E.E. Toralapa) localizada en el departamento de Cochabamba y a cargo del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF). Al mismo tiempo, se ha llevado a cabo el establecimiento de parcelas de refrescamiento en las zonas de origen: Altiplano Norte, Centro y Sur en los departamentos de La Paz y Oruro y en la E.E. Toralapa para accesiones de valle y valle alto.

Debido al incalculable valor genético con el que cuenta el Banco de Germoplasma de Quinoa,

las semillas requieren un monitoreo de la viabilidad en forma periódica para conservar la riqueza genética con la que Bolivia cuenta. Por esta razón el presente trabajo tuvo el objetivo de determinar el porcentaje de germinación de las semillas de las accesiones del Banco de Germoplasma de Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) de Bolivia, administrado por el INIAF.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en las gestiones 2010, 2011 y 2012 en los Laboratorios de Análisis de Calidad de Semillas del INIAF en las ciudades de La Paz y Cochabamba y en la E.E. Toralapa.

Inicialmente se realizó un inventario de las semillas recibidas por los anteriores administradores del Banco de Germoplasma de Granos Altoandinos, el cual se encuentra bajo administración efectiva del INIAF desde julio de 2010. Estas semillas rutinariamente son almacenadas a corto y mediano plazo en ambientes oscuros bajo condiciones naturales a temperaturas entre 8°C y 17°C y a una humedad relativa del ambiente entre 45% y 55%.

Pruebas de germinación

Las pruebas fueron realizadas bajo normas internacionales para análisis de semillas, establecidas por la International Seed Testing Association (ISTA, 2010) y las normas para bancos de genes (FAO/IPGRI, 1994). El método utilizado fue el método sobre papel en placas Petri.

Para el análisis se emplearon semillas de las 2675 accesiones de quinua (200 accesiones en 2010, 1218 accesiones en 2011 y 1257 accesiones en 2012) que contaban con cantidades de 10 g como mínimo, provenientes del Banco de Germoplasma. Las semillas fueron dispuestas sobre papel filtro humedecido con agua destilada, previamente esterilizada para prevenir daños por hongos en cuatro repeticiones de 100 semillas cada una, con previa identificación y registro de la fecha de siembra. Posteriormente fueron incubadas al interior de una cámara de germinación, a

una temperatura de 20°C, con un fotoperíodo de 8h/16h de luz/oscuridad. Se realizó un constante control de humedad y aireación.



Figura 1. Prueba de germinación mediante el método sobre papel en placas Petri.

En todas las pruebas de germinación se realizaron 2 lecturas: A los 5 y a los 7 días después de la siembra, en las cuales se evaluaron los porcentajes de plántulas normales, plántulas anormales, semillas muertas, semillas duras (latentes) y semillas frescas.



Figura 2. Semillas germinadas de quinua con características normales (izquierda) y con anomalías en la germinación (derecha).

Análisis estadístico

Las variables de germinación fueron procesadas con estadística descriptiva, con el modelo lineal generalizado bajo la distribución multinomial y la estructura del análisis de varianza de clasificación múltiple (Steel y Torrie, 1992; Montgomery, 2003).

Resultados y discusión

Inventario de semillas

En el Cuadro 1 se observa que el Banco de Germoplasma de Granos Altoandinos administrado por el INIAF conserva en la actualidad 3 104 accesiones de quinua procedentes de varios países. Bolivia se muestra como el origen de la mayor cantidad de accesiones (2 328 accesiones), seguida por Perú y Ecuador. También se observa que se tienen accesiones de las cuales se desconoce el origen. Este pormenor ya fue manejado en la base de datos de esa manera por los anteriores administradores del Banco de Germoplasma, que transfirieron el mismo al INIAF en 2010.

En referencia a la cantidad de semilla almacenada por accesión se observa que existen accesiones con muy poca cantidad de semilla (hasta 0.10 g) y accesiones con bastante cantidad de semilla (hasta 900.50 g). Estos datos preliminares evidencian la necesidad de realizar acciones de multiplicación de aquellas accesiones con menor cantidad de semilla para asegurar su conservación. Esta labor viene realizándose por el INIAF de manera prioritaria desde que se hizo cargo del Banco de Germoplasma.

Pruebas de germinación

Los resultados del análisis de estadística descriptiva de las pruebas de germinación se muestran en el Cuadro 2. Se puede advertir que existe una gran variación, expresada por la desviación estándar y los valores mínimos y máximos. La diferencia de comportamientos durante almacenamiento entre diferentes genotipos de quinua ya ha sido observada anteriormente (Castelli,

Cuadro 1. Inventario de semillas por accesión del Banco de Germoplasma de Quinua.

País de origen	Número de accesiones	Cantidad de semillas (g)			
		Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Ecuador	21	406.57	252.89	43.90	845.00
Perú	657	423.87	166.50	2.40	836.00
Bolivia	2328	342.05	211.59	0.10	900.50
Chile	15	146.54	96.89	31.50	347.70
Argentina	15	236.95	209.65	19.70	788.40
México	5	406.06	288.75	146.20	856.00
USA	1	7.50	-	7.50	7.50
Sin datos	62	205.59	106.33	9.10	851.8
Total	3104	357.99	206.53	0.10	900.50

2008). Entre las causas para estas diferencias se pueden mencionar diferencias en la tolerancia a almacenamiento y también la heterogeneidad del tiempo de almacenamiento después del refrescamiento (Castellón, 2008).

Con estos datos, las accesiones de quinua fueron organizadas gráficamente por código (Figura 7A) y por porcentaje de germinación (Figura

7B). En la Figura 7A se muestra que la variabilidad en germinación se puede deber a que las accesiones tuvieron refrescamientos en diferentes años. En la Figura 7B se visualiza que la mayoría de las accesiones tienen porcentajes de semilla germinada menores a 80%, valor que es el límite inferior recomendado para conservación de germoplasma en semillas (FAO/IPGRI, 1994).

Cuadro 2. Estadística descriptiva de la viabilidad de las semillas de las accesiones del Banco de germoplasma de quinua (%) (n = 2675).

Categoría	Media	Desv. estándar	Mín.	Máx.
Germinadas	54.14	31.05	0.00	100.00
Anormales	14.81	17.17	0.00	92.00
Muertas	18.77	23.83	0.00	99.00
Duras	2.26	6.91	0.00	80.25

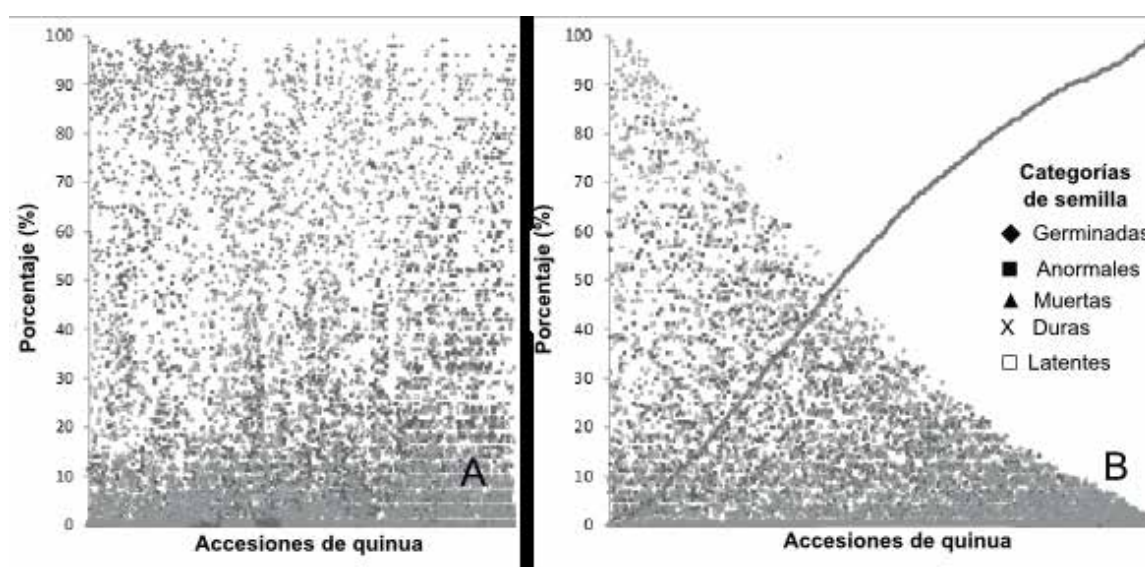


Figura 3. Ocurrencia de accesiones de quinua con semillas germinadas, anormales, muertas, duras y latentes. **A.** Ocurrencia organizada según código de pasaporte. **B.** Ocurrencia organizada en función del porcentaje de semillas germinadas.

Al efectuar un análisis de varianza se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre años en los cuales se efectuó el estudio (Figura 4), entre países dentro años (Cuadro 3) y entre departamentos dentro año y país. Este resultado se debe presumiblemente a que la mayoría de las accesiones de quinua fueron refrescadas o multiplicadas varios años atrás como se mencionó anteriormente (Castellón, 2008). Las accesiones con porcentajes de germinación menores a 80% fueron la mayoría excepto el año 2010, en el cual solamente se analizaron 200 accesiones y se observó un mayor número de accesiones con porcentajes de germinación mayores a 80%.

En base a lo que se conoce respecto a la fisiología de las semillas de quinua en condiciones de almacenamiento se puede presumir que las accesiones fueron refrescadas con una frecuencia mayor a 4 ó 5 años desde 2000.

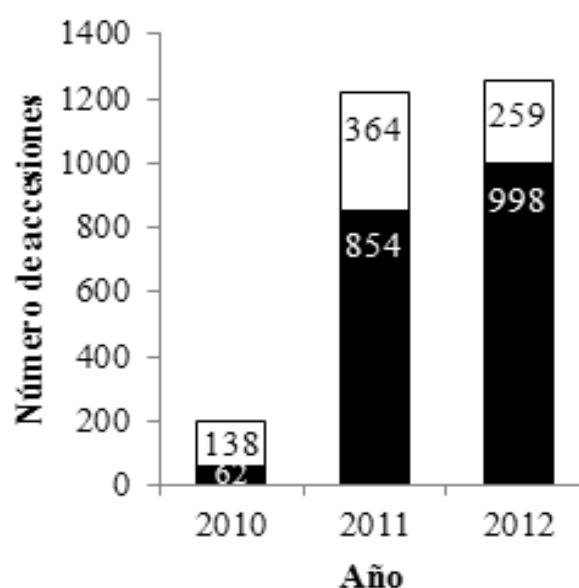


Figura 4. Ocurrencia de accesiones de quinua con semillas con porcentajes de germinación mayor a 80% (blanco) y menor a 80% (negro), por año de evaluación.

Cuadro 3. Ocurrencia de semillas germinadas de accesiones de quinua por país de origen y año de evaluación.

Año	País	Germinación				Total	
		≤80%		>80%		Accesiones	%
		Accesiones	%	Accesiones	%		
2010	Bolivia	62	31.00	138	69.00	200	100.00
	Ecuador	5	62.50	3	37.50	8	100.00
	Perú	192	55.81	152	44.19	344	100.00
	Bolivia	617	75.89	196	24.11	813	100.00
	Chile	9	60.00	6	40.00	15	100.00
2011	Argentina	9	90.00	1	10.00	10	100.00
	México	1	50.00	1	50.00	2	100.00
	Sin dato	18	78.26	5	21.74	23	100.00
	No identificado	3	100.00	0	0.00	3	100.00
	Total	854	70.11	364	29.89	1218	100.00
2012	Ecuador	8	61.54	5	38.46	13	100.00
	Perú	85	76.58	26	23.42	111	100.00
	Bolivia	891	79.84	225	20.16	1116	100.00
	Chile	1	100.00	0	0.00	1	100.00
	México	1	50.00	1	50.00	2	100.00
	Sin dato	2	100.00	0	0.00	2	100.00
	Sin dato	1	50.00	1	50.00	2	100.00
	Sin dato	2	100.00	0	0.00	2	100.00
	No identificado	7	87.50	1	12.50	8	100.00
	Total	998	79.40	259	20.60	1257	100.00
Total		1914	71.55	761	28.45	2675	100.00

Cuadro 4. Refrescamiento de accesiones de quinua por campaña agrícola y por departamento

Región	Departamento	Sitio	Numero de accesiones de quinua refrescadas por campaña agrícola		
			2010-2011	2011-2012	2012-2013
Altiplano Centro	La Paz	Estación Experimental de Patacamaya	102	211	300
Altiplano Sur	Oruro	Centro de Investigación de Quinua Real, comunidades de Cerro Grande e Irpani	69	130	70
Valles Altos	Cochabamba	Estación Experimental de Toralapa	32	320	200
Total			203	661	570

Refrescamiento de las accesiones.

En base a la información registrada se tomó la decisión de realizar el refrescamiento de la mayoría de las accesiones de quinua como tarea prioritaria para lograr el porcentaje de germinación mínimo de 85% recomendado (FAO/IPGRI, 1994) para la conservación de semilla a largo plazo en bancos de germoplasma.

En el Cuadro 4 se reportan datos preliminares de las labores de refrescamiento realizadas hasta el momento por el INIAF en 1434 accesiones de quinua entre las campañas agrícolas 2010-2011 y 2012-2013.

En general se observó que el 71.6% de las accesiones de quinua evaluadas (1914 accesiones), presentaron porcentajes de germinación menores al 80%, por lo que requieren ser refrescadas a la brevedad posible. En dicho refrescamiento se debe priorizar aquellas accesiones que presenten los porcentajes de germinación más bajos y que posean menor cantidad de semilla, para poder garantizar la preservación del germoplasma. Los resultados evidencian que las semillas de las accesiones conservadas no se encontraban en condiciones fisiológicas óptimas al ser recibidas por el INIAF en 2010.

Bibliografía

1. Castellión, M.L. 2008. Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. Tesis Ph.D. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 118 p.
2. FAO/IPGRI. 1994. Normas para bancos de genes. Roma, Italia.
3. ISTA. 2010. International rules for seed testing. ISTA. Zurich, Suiza.
4. Montgomery, D. 2003. Diseño y análisis de experimentos. Trad. Rodolfo Piña García. Limusa, Wiley. México DF, México.
5. Tapia, M. 1979. La Quinua y la Kañahua. Cultivos Andinos. Serie de libros y materiales educativos N°40. IICA/CATIE Oficina Regional para América Latina. Bogotá, Colombia.



Producción de Semilla Prebásica de cinco variedades nativas de papa provenientes del Banco de Tubérculos y Raíces Andinas

Carol Rocabado Espinoza^{1*}, Luis Mercado Martínez¹, Edwin Iquize Villca¹

¹Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, Av. Blanco Galindo Km 5.5, Casilla 832, Cochabamba, Bolivia

*Autor para correspondencia: carolrocbado@hotmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue realizar la limpieza viral y la producción de semilla prebásica de 5 variedades nativas de papa priorizadas en base a su importancia social, cultural y comercial (Laram Pala, Yana Imilla, Sani Imilla Negra, Azul Luki, Pinta Boca). El proceso de limpieza viral (termoterapia y cultivo de meristemos) fue exitoso en las 5 variedades priorizadas para 7 especies virales (PVX, PVY, PLRV, PVS, APMV, APLV y PVA). En el proceso de producción de semilla prebásica se obtuvieron 5 calibres de tubérculos (II-VI) y un rendimiento de entre 4.4 Kg•m⁻² y 6.1 Kg•m⁻², dependiendo de la variedad. El número de tubérculos obtenidos también varió en función de la variedad entre 313 tubérculos•m⁻² y 882 tubérculos•m⁻². Es necesario profundizar el presente trabajo mediante una valoración de la incidencia viral antes y después del proceso de limpieza viral y haciendo una comparación con variedades mejoradas bolivianas.

Palabras clave: Semilla prebásica, *Solanum tuberosum* spp. *andigenum*, multiplicación

Abstract

The objective of this work was to perform virus elimination and production of pre-basic seed potato of 5 native landraces prioritized based on their social, cultural and commercial importance (Laram Pala, Yana Imilla, Sani Imilla Negra, Azul Luki, Pinta Boca). The process of virus elimination (thermotherapy and meristem culture) was successful in the 5 prioritized landraces for 7 viral species (PVX, PVY, PLRV, PVS, APMV, APLV and PVA). In the process of producing pre-basic seed potato, 5 calibers of tubers were obtained (II-VI) and a yield that ranged from 4.4 Kg•m⁻² to 6.1 Kg•m⁻², depending on the landrace. The number of tubers obtained also varied as a function of the landrace between 313 tubers•m⁻² and 882 tubers•m⁻². It is necessary to deepen the present study through a measurement of the viral incidence before and after the process of virus elimination and making a comparison with improved Bolivian cultivars.

Keywords: Pre-basic seed, *Solanum tuberosum* spp. *andigenum*, multiplication



Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cultivo de mayor importancia alimentaria después de los cereales (CIP, 2010), ocupando un lugar preponderante en muchos países. Actualmente está difundida en 138 países, distribuida en 18 millones de hectáreas (Quiñones et al., 2004).

En Bolivia se cultiva en pequeñas superficies dentro de zonas altas e interandinas, representando la principal fuente de ingresos de 125 000 personas en la fase productiva, industrial y de comercialización (Gabriel et al., 2011). Tiene un rendimiento promedio de $6 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, pudiendo alcanzar en los valles interandinos de Cochabamba y mesotérmicos de Santa Cruz hasta $10 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, mientras que el rendimiento a nivel mundial es de $16 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Una de las razones que explica esta situación es el uso de semilla de baja calidad, procedente de plantas infectadas con virus en sucesivas campañas de siembra (semilla “cansada”). El agricultor bajo estas condiciones no desea utilizar tubérculo-semilla de su propia cosecha (Iriarte et al., 2001).

Esto hace necesario avanzar hacia técnicas más eficientes, que permitan producir semilla de alta calidad genética y sanitaria, que se encuentre disponible para los agricultores, evitando de esta forma que cultivares nativos degenerados sean descartados y reemplazados por otros cultivos, perdiéndose la diversidad genética nativa (Iriarte et al., 2001).

Uno de los sistemas que permite la obtención de material de alta sanidad, es la producción de semilla prebásica en ambientes confinados que evitan la entrada de vectores y aíslan el ambiente, con la finalidad de evitar focos de infección viral todo el año, obteniendo así un sistema de producción a largo plazo. Para esto es importante disponer de núcleos iniciales generados de plantas *in vitro* de la más alta calidad sanitaria (Hidalgo et al., 1997).

En ese entendido y a solicitud de las instituciones dedicadas a la producción de semilla de papa del Departamento de Cochabamba, Federación de Semilleristas de Cochabamba (FEDESCO), la Asociación de Productores de Semilla de Papa (APROSEPA, Potosí - Villazón) y de los agricultores interesados, se seleccionaron varios cultivares nativos, de los cuales cinco fueron elegidos en base a su importancia social, cultural y comercial, para ser sometidos a un proceso de limpieza viral y producción de semilla prebásica.

La presente publicación, evalúa el comportamiento productivo de semilla prebásica de cada una de las 5 variedades nativas seleccionadas, que serán entregadas por el INIAF a los productores de semilla de papa de las zonas tradicionales de producción de papas nativas del país, reafirmando así el rol del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF) en la conservación y manejo de germoplasma de tubérculos andinos y su aporte a la seguridad con soberanía alimentaria de nuestros pueblos.

Materiales y Métodos

Esta experiencia se desarrolló en la Estación Experimental Toralapa (E.E. Toralapa) del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), dependiente del Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras (MDRyT), en el departamento de Cochabamba durante la campaña 2012-2013. Dicho trabajo se realizó en dos fases: Fase de multiplicación *in vitro* y fase de producción en invernadero, de acuerdo a protocolos utilizados anteriormente (Aguirre et al., 2010).

Material Vegetal

Como material vegetal se utilizaron vitro-plantas de papa, de las accesiones detalladas en el Cuadro 1, libres de virus, testadas mediante la prueba de inmunoabsorción con conjugados enzimáticos, modalidad directa de emparejado de doble anticuerpo (DAS-ELISA).

Cuadro 1. Origen de las cinco accesiones (variedades nativas) del Banco de Tubérculos y Raíces Andinas, priorizadas para la producción de semilla prebásica. Se utiliza la clasificación taxonómica propuesta por Huaman y Spooner (2002).

Código	Nombre	Especie	Departamento
BOL1382	Laram Pala	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i> (Juz. & Bukasov) Hawkes	Oruro
BOL2840	Yana Imilla	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i> (Juz. & Bukasov) Hawkes	Potosí
BOL2878	Sani Imilla Negra	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i> (Juz. & Bukasov) Hawkes	La Paz
BOL3381	Azul Luki	<i>Solanum juzepczukii</i> Bukasov	Potosí
BOL4827	Pinta Boca	<i>Solanum stenotomum</i> Juz. & Bukasov	Cochabamba

Multiplicación de plántulas *in vitro*

El periodo de multiplicación tuvo una duración de tres meses, siguiendo la proyección de producción de semilla prebásica de papa 2012-2013 en la E.E.Toralapa. Se usó una progresión geométrica, con dos factores para el cálculo del volumen de producción: el factor de multiplicación (1:4) y la velocidad de crecimiento (27 días). Se colocaron 25 explantes en cajas plásticas transparentes de 6×10 cm (magenta) con medio de cultivo desarrollado en el centro internacional de la papa (CIP) compuesto por sales y minerales de Murashige y Skoog (1962), tiamina 0.4 mg•L⁻¹, mioinositol 100 mg•L⁻¹, paca 2 mg•L⁻¹ y sacarosa 3%, ajustado a un pH de 5.7. Las condiciones de cultivo fueron: 16 h de fotoperiodo con luz fluorescente (2000-2500 lux) y temperatura de 21°C.

Para la fase de emisión de raíces, última etapa de la multiplicación, se adicionó al medio de cultivo 3 g•L⁻¹ de carbón activado.

Producción en invernadero

Las plántulas propagadas *in vitro*, fueron trasplantadas en camas de madera con substrato estéril, compuesto por dos partes de arena y una de tierra vegetal (2:1), esterilizado a 90°C y a 4 atm de presión. Estas se extrajeron del medio sintético con ayuda de una pinza y con mucho cuidado se distribuyeron de forma espaciada en cinco hileras a una densidad de 50 plantas•m⁻², en hoyos de 3-4 cm de profundidad, cubriendo aproximadamente dos tercios de la plántula (2 a 3 nudos dentro del substrato). Luego se presionó con firmeza el suelo alrededor de las plántulas con la finalidad de favorecer el contacto entre el suelo y la raíz.

tulas con la finalidad de favorecer el contacto entre el suelo y la raíz.

Durante las primeras dos semanas, se mantuvieron las camas cubiertas con malla semisombra (35 % de transparencia) con el objetivo de mantener el ambiente sombreado fresco y húmedo, evitando la deshidratación de las vitro plántulas y para que la adaptación a su nuevo medio sea favorable.

Para prevenir efectos de hongos de suelo como los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, etc. se realizó la aplicación de Fludioxonil + Metalaxil-M (Maxim®XL, Syngenta S.A.) al suelo antes de la siembra, de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Se desarrolló una estrategia de control de enfermedades fungosas en follaje basada en aplicaciones periódicas de Clorotalonil (Bravonil®720, Syngenta S.A.), Mancozeb (Dithane®80 NT, Dow Agrosciences S.A.) y Mancozeb + Oxiclورو de cobre (Cobrethane®, Dow Agrosciences S.A.), de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. Para evitar la presencia de vectores al interior del invernadero se aplicó a la infraestructura, antes de la siembra, Lambda-cihalotrina (Karate Zeon®, Syngenta S.A.) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y en adelante de forma regular cada 15 días, para mantener a las plántulas libres del ataque de insectos.

Las plantas se regaron todos los días hasta capacidad de campo durante la fase de aclimatación (primeros 14 días) y luego cada 48 h, hasta el momento de su defoliación, cuando se suprimió el riego.



La fertilización de macro nutrientes se realizó con un fertilizante de síntesis (Kelpak®, Compo Agro Ltda.) con un nivel de 150-150-150 a razón de 300 g aplicado en forma fraccionada: Una primera aplicación al momento del trasplante de 115 g y 185 g en el aporque. Para cubrir los requerimientos de micro nutrientes se realizaron aplicaciones foliares de Mn, Fe, Cu, Zn, B, Mo, MgO y S (Fetrilon® Combi 1, Compo GMBH & Co.). Finalmente se realizaron aplicaciones para promover el desarrollo del follaje, raíces y tuberización con K₂O + SiO₂ (AgriSil®K50, Plant Health Products Ltd.) y con una mezcla de péptidos y nucleótidos (PerfectDigest®FPI, Bluewave Marine Ingredients).

Para el control de calidad, se realizó una prueba de control de virus (PVX, PVY, PLRV, PVS, APMV, APLV y PVA), por medio del test de DAS-ELISA.

La defoliación se realizó cuando las plantas completaron su ciclo biológico (más de 50% del follaje amarillo). La cosecha se realizó a los 160 días de la siembra, aproximadamente 14 días después de la defoliación.

La clasificación de los tubérculos cosechados consistió en separar los tubérculos de acuerdo al tamaño establecido para su comercialización: >40 mm = calibre II, 30-40 mm = calibre III, 20-30 mm = calibre IV, 10-20 mm = calibre V y <10 mm = calibre VI, para ser pesados y contados por calibre. Finalmente los tubérculos fueron almacenados.

Diseño y Análisis Estadísticos

Las variables peso de tubérculos por tamaño y total fueron procesados con el modelo lineal general bajo la estructura del diseño completamente al azar. Esta estructura también se empleó para el número de tubérculos pero fue procesado con el modelo lineal generalizado bajo el supuesto de distribución de Poisson (Montgomery, 2003; SAS Institute Inc., 2013; Steel, Torrie and Dickey, 1997). El porcentaje total de tubérculos se obtuvo a partir de la fórmula.

$$\text{Tubérculos(\%)} = \frac{\text{No. de tubérculos obtenidos por calibre}}{\text{No. total de tubérculos por cama}} \times 100$$

A partir de este dato y del rendimiento se determinó el efecto de la variedad dentro de cada calibre. Para esto se utilizaron las pruebas de Wald y de χ^2 , separándose las medias mediante la prueba t de Tukey.

Resultados y Discusión

Limpieza viral de variedades

Como se observa en el Cuadro 2 los resultados obtenidos mediante la prueba DAS-ELISA fueron negativos para las variedades priorizadas y para los siete virus considerados.

Multiplicación de plántulas *in vitro* libres de virus

Una vez realizada la termoterapia, el cultivo de meristemas y la prueba DAS-ELISA se procedió a la multiplicación de las vitroplantas para

Cuadro 2. Resultados de la prueba DAS-ELISA para detección de 7 especies de virus en plantines provenientes de laboratorio sometidos a termoterapia y cultivo de meristemas (Lab) y en plantines provenientes de invernadero (Inv) de las cinco variedades nativas priorizadas para producción de semilla prebásica.

Variedad	PVX		PVY		PVS		PLRV		PVA		APMV		APLV	
	Lab	Inv	Lab	Inv	Lab	Inv	Lab	Inv	Lab	Inv	Lab	Inv	Lab	Inv
Laram Pala	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Yana Imilla	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sani Imilla Negra	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Azul Luki	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Pinta Boca	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-): Negativo

cubrir el requerimiento de 20 camas en invernadero de acuerdo a lo detallado en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número de vitroplantas libres de virus y número de camas en invernadero por variedad.		
Variedad	No. de vitroplantas	No. de camas
Laram Pala	1015	5
Yana Imilla	1315	6
Sani Imilla Negra	1315	6
Azul Luki	450	2
Pinta Boca	235	1

Producción de semilla prebásica

De acuerdo a los resultados que se presentan en el Cuadro 4, se produjeron 321.7 Kg y 32 345 tubérculos de las cinco variedades, siendo la variedad Yana Imilla la que tuvo los rendimientos más altos tanto en peso (109.0 Kg) como en número de tubérculos (15 869).

Adicionalmente se observó que, del total producido en peso, el calibre III representó el mayor porcentaje (32.85%) y el calibre VI representó el menor (1.21%). Para el número de tubérculos por calibre, se obtuvo un mayor porcentaje en el calibre V (37.68%), seguido del calibre IV (29.07%).

Proporción de número de tubérculos por tamaño y por variedad

En la Figura 1 se muestra que, de las cinco variedades en estudio, las variedades Sani Imilla Negra y Pinta Boca fueron las que presentaron las proporciones en número de tubérculos de calibre II (15.3% y 8.1%, respectivamente). En lo que respecta al calibre III, la mayor proporción se observó en la variedad Azul Luki (28.7%) y la menor en Yana Imilla (10.2%). Las

variedades Laram Pala y Azul Luki presentaron una mayor proporción de número de tubérculos en el calibre IV (34.6% y 33.6%, respectivamente). En la variedad Laram Pala se observó una proporción en número de tubérculos del calibre V próxima al 50% y en la variedad Azul Luki una menor proporción en este calibre (32.2%). Asimismo, se muestra que la variedad Yana Imilla fue la única con tubérculos de calibre VI (21.5%).

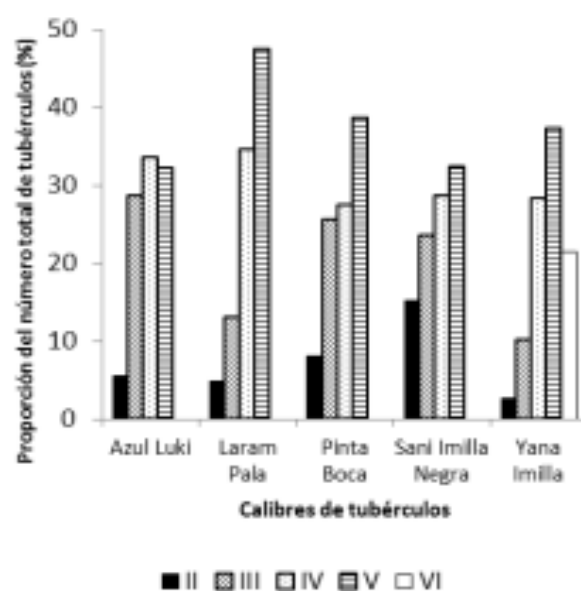


Figura 1. Proporción del número de tubérculos por calibre, según variedades nativas.

El análisis de la razón de probabilidad para la ocurrencia del número de tubérculos por tamaño mostró que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre las variedades en cuanto a la proporción del número de tubérculos.

Cuadro 4. Resumen de producción de semilla prebásica de las cinco variedades nativas, expresada en número de tubérculos y en peso en kilogramos, mostrada por variedad y calibre.

Variedad	II		III		IV		V		VI		Total	
	No.	Peso	No.	Peso	No.	Peso	No.	Peso	No.	Peso	No.	Peso
Laram Pala	162	7.4	435	9.4	1 147	11.5	1 571	4.3			3 315	32.6
Yana Imilla	421	14.5	1 618	31.1	4 500	40.5	5 920	19.0	3410	3.9	15 869	109.0
Sani Imilla Negra	716	39.8	1 107	28.1	1 351	16.0	1 521	4.7			4 695	88.6
Azul Luki	55	2.5	284	6.2	333	3.2	319	1.2			991	13.1
Pinta Boca	650	21.7	1 894	30.9	2 074	16.8	2 857	9.0			7 475	78.4
Total	2 004	85.9	5 338	105.7	9 405	88	12 188	38.2	3 410	3.9	32 345	321.7

Número promedio de tubérculos y número de tubérculos por unidad de superficie

Cuadro 5. Promedio del número de tubérculo según el calibre y según las variedades nativas.

Variedad	II	III	IV	V	VI
Laram Pala	27.0 c	72.5 c	191.2 b	261.8 b	0.0
Yana Imilla	23.3 cd	90.0 b	249.8 a	329.0 a	1 137.0
Sani Imilla Negra	47.8 a	73.8 c	89.8 d	101.4 d	0.0
Azul Luki	18.3 d	94.7 b	111.0 cd	106.3 d	0.0
Pinta Boca	35.8 b	113.0 a	121.0 c	170.0 c	0.0

Promedios indicados con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes ($p=0.05$) según las pruebas de mínimos cuadrados y χ^2 .

El número de tubérculos promedio para el calibre II fue mayor en la variedad Sani Imilla Negra (47.8). Para el calibre III, el máximo número promedio de tubérculos se obtuvo con la variedad Pinta Boca (113.0). La variedad Yana Imilla presentó el mayor número promedio de tubérculos para los calibres IV y V (249.8 y 329.0, respectivamente). En todos los casos se registraron diferencias significativas ($p=0.01$) entre variedades dentro de los calibres de tubérculos (Cuadro 5).

En cuanto al número de tubérculos por unidad de superficie (Figura 2), se puede observar que la variedad Yana Imilla fue la variedad con mayor productividad (881.5 tubérculos•m⁻²), seguida de la variedad Laram Pala (552.5 tubérculos•m⁻²). La variedad con menor productividad fue Azul Luki (330.3 tubérculos•m⁻²).

Peso de tubérculos por calibre y por unidad de superficie

Como se observa en el Cuadro 6, se evidenciaron diferencias significativas entre las variedades para el rendimiento promedio de tubérculos por unidad de superficie para todos los calibres excepto el III. En el calibre II se obtuvo el mayor rendimiento con la variedad Sani Imilla Negra (2.66 Kg•m⁻²). Para el calibre III, pese a no evidenciarse diferencias significativas, el mayor rendimiento se registró con la variedad Azul Luki (2.07 Kg•m⁻²). La variedad Yana

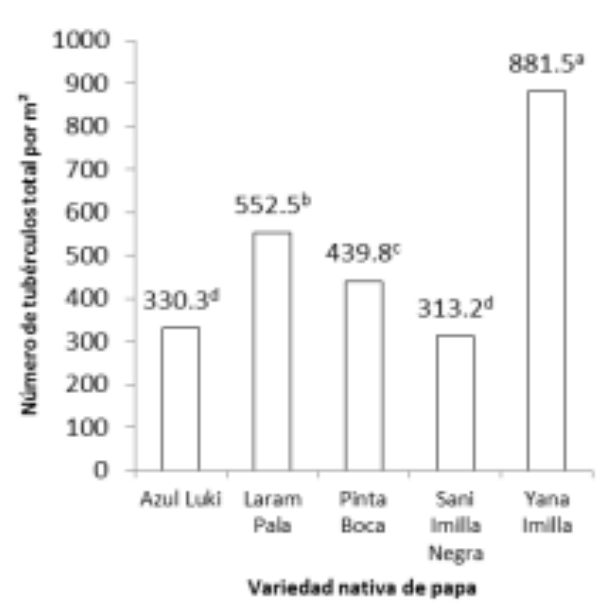


Figura 2. Número de tubérculos por unidad de superficie según variedades nativas. Promedios indicados con la misma letra no son significativamente diferentes ($p=0.05$) según las pruebas de mínimos cuadrados y χ^2 .

Imilla tuvo los mayores rendimientos para los calibres IV y V (1.06 Kg•m⁻² y 0.22 Kg•m⁻², respectivamente).

Cuadro 6. Rendimiento promedio de tubérculos (Kg•m⁻²) según el calibre y según las variedades nativas.

Variedad	II	III	IV	V	VI
Laram Pala	1.23 b	1.57 a	1.92 a	0.40 c	0.00
Yana Imilla	0.81 b	1.73 a	2.25 a	1.06 a	0.22
Sani Imilla Negra	2.66 a	1.87 a	1.07 b	0.31 c	0.00
Azul Luki	0.83 b	2.07 a	1.07 b	0.40 c	0.00
Pinta Boca	1.16 b	1.81 a	0.97 b	0.54 bc	0.00

Promedios indicados con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes ($p=0.05$) según las pruebas de mínimos cuadrados y t de Tukey.

En cuanto al rendimiento total de tubérculos por variedad (Figura 3) se observó que con la variedad Yana Imilla se obtuvo el rendimiento más alto (6.06 Kg•m⁻²), seguido por el de la variedad Sani Imilla Negra (5.91 Kg•m⁻²). El rendimiento más bajo se registró con la variedad Azul Luki (4.37 Kg•m⁻²).

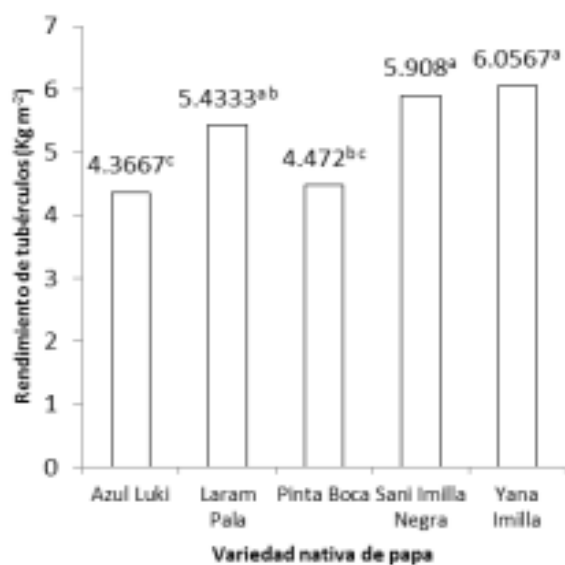


Figura 3. Rendimiento de tubérculos por unidad de superficie según variedades nativas. Promedios indicados con la misma letra no son significativamente diferentes ($p=0.05$) según las pruebas de mínimos cuadrados y *t* de Tukey.

Conclusiones

Las variedades (accesiones) provenientes del Banco de Germoplasma administrado por el INIAF, Laram Pala, Yana Imilla, Sani Imilla Negra, Azul Luki y Pinta Boca, fueron sometidas a termoterapia y cultivo de meristemos y fueron exitosamente liberadas de los virus PVX, PVY, PVS, PLRV, PVA, APMV y APLV.

Se produjeron 321.7 Kg y 32 345 tubérculos de semilla pre básica de las cinco variedades en los calibres II, III, IV, V y VI.

En experiencias anteriores con variedades de papas nativas se han reportado niveles de limpieza viral de hasta 95% utilizando termoterapia y cultivo de meristemos (Delgado et al., 2010). Es necesario mencionar que dichos niveles probablemente hayan sido superados en el presente trabajo, pero para hacer tal aseveración es necesario hacer un estudio sistemático de la metodología empleada. Como ejemplo se puede mencionar que el rendimiento obtenido por la variedad Sani Imilla Negra en el presente estudio (5,91 Kg•m⁻²) fue superior al reportado

previamente (0.8 Kg•m⁻²) bajo condiciones de camas protegidas en la E.E. Toralapa (Iriarte et al., 2001).

En lo que respecta a la infección natural por virus encontrada en cultivares nativos en el Perú (Bertschinger et al., 1990), se ha reportado que existe una mayor incidencia de PLRV y APLV en cultivares nativos (*Solanum goniocalyx*, *S. chaucha* y *S. tuberosum* ssp. *andigenum*). Estos datos indican que es necesario profundizar el presente trabajo haciendo una valoración de la incidencia viral antes y después de la limpieza viral y haciendo una comparación con variedades mejoradas bolivianas, existentes en el Banco de Germoplasma administrado por el INIAF. De esta manera, además de la limpieza viral se le estará dando un valor agregado al material genético conservado.

Agradecimientos

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto Coreano para la Agricultura Internacional (KOPIA) de la Agencia de Cooperación Internacional de Corea (KOICA). Se agradece profundamente dicha cooperación.

Referencias

- Aguirre, G; Baudoin, J.P; Leigue, L. 2010. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos filogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia.
- Bertschinger, L; Scheidegger, U; Luther, K; Pinillos, O; Hidalgo, A. 1990. La incidencia de virus de papa en cultivares nativos y mejorados en la Sierra Peruana. Revista Latinoamericana de la Papa. 3: 62-79.
- CIP. 2010. Facts and figures about potato. CIP. Lima, Perú.
- Delgado, C; Monteros, C; Benítez, J. 2010. Evaluación de tres sistemas de termoterapia y

cultivo de meristemas en cuatro variedades promisorias de papas nativas (*Solanum* spp.) para la erradicación de virus. En I Congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de Papas Nativas: Memorias. INIAP. Quito, Ecuador.

Gabriel, J; Pereira, R; Gandarillas, A. 2011. Catálogo de nuevas variedades de papa en Bolivia. PROINPA. Cochabamba, Bolivia.

Hidalgo, O; Marca, J; Palomino, L. 1997. Producción de semilla prebásica y básica usando métodos de multiplicación acelerada. CIP. Lima, Perú.

Huaman, Z; Spooner, D.M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). American Journal of Botany. 89(6): 947-965.

Iriarte, V; Badani, A.G; Villarroel, C.L; Aguirre, G; Fernández-Northcote, E.N. 2001. Priorización, limpieza viral, producción de semilla de calidad básica y devolución de cultivares nativos libres de virus. Revista Latinoamericana de la Papa. 12: 72-95.

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.

Quiñones, Y; Izquierdo, H; Martínez, O; Alcántara, P; Rodríguez, E. 2004. Métodos alternativos para la producción de semilla prebásica de papa (*Solanum tuberosum* L.). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba. 35(3): 23-27.