

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEIS ACCESIONES DE PAPA AMARGA (*Solanum juzepcsukii* Buck) CON TRES CONCENTRACIONES DE DESINFECTANTE EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA-UPEA.

IN VITRO ESTABLISHMENT OF SIX ACCESSIONS OF BITTER POTATO (*Solanum juzepcsukii* Buck) WITH THREE DISINFECTANT CONCENTRATIONS IN THE LABORATORY OF BIOTECHNOLOGY-UPEA.

Flores Jhenny,² Chávez Soledad¹

¹Docente Investigador Cultivo de tejidos vegetales – Universidad Pública de El Alto – Carrera Ingeniería Agronómica

*Autor correspondiente.

²Estudiante Investigador Ingeniería Agronómica Universidad Pública de El Alto.

Resumen

Bolivia es centro de origen, diversificación y domesticación de numerosas especies y variedades de papas nativas y amargas, pero en los últimos años se ha notado una reducción en la producción, el consumo y la utilización de estas variedades. Debido a sus características las papas amargas se establecen como material genético potencial para la adaptación al cambio climático a través de programas de fitomejoramiento, pero casi ninguna es su investigación en el campo de la biotecnología. Por lo que, la investigación tiene como objetivo la generación de protocolo de establecimiento de seis accesiones de papa amarga a condiciones in vitro, a partir de la determinación del porcentaje de establecimiento, y contaminación por hongos, bacterias, fenolización, necrosis, oxidación y engrosamiento de tallo; con tres concentraciones de desinfectante en el laboratorio de biotecnología de la carrera de Ingeniería Agronómica de la UPEA. Se emplearon brotes de seis accesiones de papa amarga (*Solanum juzepcsukii*) PA-002, PA-003, PA-010, PA-012, PA-013 y PA-014 procedentes de la colección de Banco de Germoplasma de Tubérculos Andinos de la Carrera de Ingeniería Agronómica – UPEA, los cuales en una primera disección de 1.5 cm fueron desinfectados en alcohol al 70% durante 1 minuto, seguido de una segunda desinfección de tres niveles de concentraciones 0.5%, 1.0% y 1.5% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 15, 10 y 5 minutos respectivamente. Los explantes, llevados a una cámara de flujo laminar, fueron diseccionados por segunda vez a 1-3mm y sembrados en un medio de cultivo MS. Y finalmente, incubados en la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) y 20°C durante 28 días. Se generó el protocolo de establecimiento de papa amarga a condiciones in vitro para las accesiones PA-002, PA-003, PA-010, PA-0013 con 1.5% de NACIO durante 5 minutos, de la accesión PA-012 con 0.5% de NACIO durante 15 minutos y de la accesión PA-014 con 1.0% de NACIO durante 10 minutos de desinfección. La información obtenida es un primer paso para trabajar con variedades de papa amarga altamente valiosas para conservar y revalorizar nuestra diversidad.

Palabras claves Papa amarga, In vitro, Establecimiento.

Abstract

Bolivia is the center of origin, diversification and domestication of numerous species and varieties of native and bitter potatoes, but in recent years there has been a reduction in the production, consumption and use of these varieties. Due to their characteristics, bitter potatoes are established as a potential genetic material for adaptation to climate change through breeding programs, but almost none is their research in the field of biotechnology. Therefore, the objective of the research is to generate a protocol for the establishment of six accessions of bitter potatoes to in vitro conditions, based on the determination of the percentage of establishment, and contamination by fungi, bacteria, phenolization, necrosis, oxidation and thickening of stem; with three concentrations of disinfectant in the biotechnology laboratory of the Agricultural Engineering degree at UPEA. Outbreaks of six accessions of bitter potato (*Solanum juzepcsukii*) PA-002, PA-003, PA-010, PA-012, PA-013 and PA-014 from the Andean Tubers Germoplasm Bank collection were used of Agronomic Engineering - UPEA, which in a first dissection of 1.5 cm were disinfected in 70% alcohol for 1 minute, followed by a second disinfection of three levels of concentrations 0.5%, 1.0% and 1.5% sodium hypochlorite (NaClO) for 15, 10 and 5 minutes respectively. The explants, taken to a laminar flow chamber, were dissected a second time at 1-3mm and seeded in an MS culture medium. And finally, incubated in the growth chamber with a photoperiod of 16/8 (light / dark) and 20 °

C for 28 days.

The protocol for establishing bitter potato at in vitro conditions was generated for accessions PA-002, PA-003, PA-010, PA-0013 with 1.5% NACIO for 5 minutes, from accession PA-012 with 0.5% of NACIO for 15 minutes and accession PA-014 with 1.0% NACIO for 10 minutes of disinfection. The information obtained is a first step to work with highly valuable bitter potato varieties to preserve and revalue our diversity.

Keywords Bitter potato, In vitro, Establishment.

1. Introducción

La papa es un cultivo originario de la zona andina. Su importancia radica en el rol social, nutricional y económico que representa para los habitantes del Altiplano y Valles. (Ramos, 2012). Bolivia y Perú comparten el centro de origen de la papa, teniendo una amplia variabilidad genética. La diversidad genética de la papa se conserva en condiciones in situ (predios de agricultores) y ex situ (bancos de germoplasma), a pesar de la conservación, parte de la diversidad se ha perdido debido a una serie de factores (mercado, heladas, sequía, plagas, enfermedades, etc.), (Estrada citado por Ramos, 2012).

Se estima que un 15% de la producción total de Bolivia corresponde a los cultivares más o menos amargos; de este porcentaje el 10% se destina a la elaboración de chuño, tunta o moraya y a kachu chuño. Regionalmente, estos porcentajes son superiores donde aparecen las tendencias productivas a favor de determinadas especies y fenotipos (Canqui y Morales, 2008).

Las papas amargas poseen características muy valiosas como la bromatológica: contenidos superiores de materia seca, proteínas y aminoácidos esenciales; agronómicas: alta productividad, resistencia a las heladas, salinidad, sequía, resistencia a algunos virus, nematodos y enfermedades. Pero también, tienen un alto contenido de glicoalcaloides, lo cual las hace no aptas para su consumo directo. Por ello deben someterse los tubérculos al procesamiento que se sigue para la elaboración del chuño en zonas muy altas (Estrada, 1992).

Las papas amargas tienen gran potencial en zonas con alto riesgo climático, especialmente *Solanum juzepczukii*, debido a su mayor tolerancia a las bajas temperaturas y su mayor variabilidad genética que permitiría seleccionar clones más tolerantes al ataque de la verruga y con menor contenido de glicoalcaloides (Huanco, 1991).

La papa, es continuamente estudiada en las variedades consideradas comerciales o de alta calidad culinaria, mientras que las variedades

amargas reciben poca o ninguna atención, a pesar de que en ellas encierran características particularmente importantes para la producción de este cultivo en la zona del Altiplano. En el campo de la biotecnología la de papa amarga no cuentan con protocolos de establecimiento bajo condiciones in vitro.

La conservación del material genético de papas amargas podría ser de gran importancia en programas de fitomejoramiento para realizar cruzamientos que busquen potenciar el rendimiento del cultivo, debido a que cuentan con valiosas propiedades de productividad, permitiendo seleccionar en pocas generaciones papas de tipo más comercial para los productores del Altiplano boliviano, y evitar que variedades de papas amargas se vayan perdiendo debido a una falta de importancia en el mercado.

La Biotecnología Vegetal permite reducir la pérdida de diversidad genética estableciendo protocolos para el manejo de especies nativas con énfasis en aquellas que se encuentran amenazadas. Por tanto, el interés de la presente investigación fue la de estandarizar un protocolo de establecimiento de seis accesiones de papa amarga (*Solanum juzepczukii*) a condiciones in vitro, a partir de la determinación del porcentaje de establecimiento y contaminación por hongos, bacterias, fenolización, necrosis, oxidación y engrosamiento de tallo; con tres concentraciones de desinfectante en el laboratorio de biotecnología-UPEA.

2. Materiales y métodos

Localización

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal dependiente de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto, ubicada en la provincia Murillo, Ciudad de El Alto del Departamento de La Paz.

Geográficamente está ubicado a 16° 29' 32" Latitud Sud y 68° 11' 38" Longitud Oeste, a una altura de 4067 m.s.n.m.

Materiales

Material de estudio: Para la presente investigación se emplearon los brotes de seis accesiones de papa amarga (*Solanum juzepcsukii*) PA-002, PA-003, PA-010, PA-012, PA-013 y PA-014 (figuras a, b, c, d, e y f correspondientemente) procedentes de la colección de Banco de Germoplasma de Tubérculos Andinos de la Carrera de ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto.

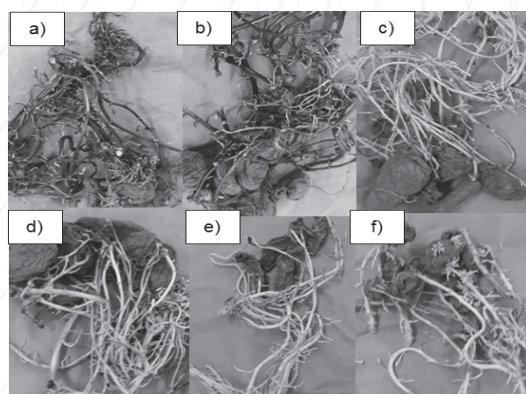


Figura 1. Accesiones de papa amarga (*Solanum juzepcsukii*). a) PA-002. b) PA-003. c) PA-010. d) PA-012. e) PA-013. f) PA-014.

Metodología

Procedimiento experimental

La presente investigación se desarrolló en las siguientes etapas dentro de la fase de establecimiento:

Separación de los explantes: Se realizó la disección de los brotes de papa separando fragmentos de 1.5 cm e identificando las accesiones.

Lavado de las plantas donadoras: El material vegetal se lavó con agua de grifo y con unas gotas de detergente; sometidas posteriormente a enjuagues sucesivos.

Desinfección de los explantes: Los explantes provenientes de los brotes de los tubérculos fueron sumergidos en alcohol al 70% durante 1 minuto, seguidamente cada variedad se transfirió por partes a tres niveles de concentraciones 0.5%, 1.0% y 1.5% de hipoclorito de sodio (NaClO) como desinfectante durante 15, 10 y 5 minutos respectivamente.

Siembra de los explantes al medio de cultivo: Posteriormente dentro de la cámara de

flujo laminar, se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril para después realizar la segunda disección del material vegetal de 1-3 mm. Luego los explantes obtenidos se sembraron en tubos de ensayo con medio basal de Murashige y Skkog (1962). Y finalmente, fueron incubados en la cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad) y 20°C durante 28 días.

Recolección de los datos: Se recolectó datos sobre porcentaje de contaminación por hongos, bacterias, presencia de necrosis, fenolización, oxidación y engrosamiento de tallo a los 7 días después de la siembra de los meristemos de brotes de las seis accesiones de papa amarga, dando el valor de 2 para casos afirmativos de las variables mencionadas y 1 en caso de ausencia para su posterior análisis.

Diseño Experimental

Para analizar los efectos generados por las seis accesiones y tres niveles de concentración de desinfección durante el establecimiento de papa amarga se empleó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial y 20 repeticiones, debido a que en laboratorio se tienen condiciones controladas, como indica Little, (1991). El diseño experimental empleado es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha * \beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Una observación cualquiera.

μ = Media general del experimento.

α_i = Efecto de la i-ésima variedad

β_j = Efecto del k-ésima concentración del desinfectante

$(\alpha * \beta)_{ij}$ = Interacción de la i-ésima variedad y la k-ésima concentración.

ϵ_{ijk} = Error experimental.

Factores de estudio

Factor A: Accesiones de papa amarga

PA – 002; PA – 003; PA – 010

PA – 012; PA – 013; PA – 014

Factor B: Concentración del desinfección (NaClO)
0,5 % (15 min.); 1,0 % (10 min.); 1,5 % (5 min.)

Tratamientos:

- T1 = PA-002, 0.5% por 15 min.
- T2 = PA-002, 1.0% por 10 min.
- T3 = PA-002, 1.5% por 5 min.
- T4 = PA-003, 0.5% por 15 min.
- T5 = PA-003, 1.0% por 10 min.
- T6 = PA-003, 1.5% por 5 min.
- T7 = PA-010, 0.5% por 15 min.
- T8 = PA-010, 1.0% por 10 min.
- T9 = PA-010, 1.5% por 5 min.
- T10 = PA-012, 0.5% por 15 min.
- T11 = PA-012, 1.0% por 10 min.
- T12 = PA-012, 1.5% por 5 min.
- T13 = PA-013, 0.5% por 15 min.
- T14 = PA-013, 1.0% por 10 min.
- T15 = PA-013, 1.5% por 5 min.
- T16 = PA-014, 0.5% por 15 min.
- T17 = PA-014, 1.0% por 10 min.
- T18 = PA-014, 1.5% por 5 min.

Variables de Respuesta:

Contaminación por hongos y bacterias:

Se identificó las vitroplantas contaminadas y no contaminadas durante el establecimiento después de los 7 y 28 días.

Presencia de fenolización, oxidación, necrosis y engrosamiento de tallo: Se identificó las vitroplantas con presencia de fenolización, oxidación, necrosis y engrosamiento de tallo a los 7 y 28 días después de su establecimiento.

Porcentaje de establecimiento: Se determinó el porcentaje de establecimiento de las vitroplantas dentro de los tratamientos, de acuerdo al número de vitroplantas iniciales y finales:

Se realizó la comparación de medias a variables que presentaron diferencias significativas, a través de la prueba de rango múltiple de Duncan con una probabilidad estadística del 5%.

3. Resultados y discusión

3.1 Contaminación por hongos

De acuerdo al análisis de varianza, sobre la contaminación por hongos que se muestra en el Cuadro 1, se establece que no existen diferencias estadísticas en el establecimiento de seis accesiones de papa amarga con tres concentraciones de desinfectante.

Cuadro 1. Análisis de varianza para la contaminación por hongos

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
A	5	0.07	0.01	2.0	0.0792 N.S.
B	2	0.01	0.004	0.5	0.6071 N.S.
A*B	10	0.04	0.004	0.5	0.8892 N.S.
Error	252	1.87	0.007		
Total	269	1.99			

$$CV = 8.54\%$$

El coeficiente de variación (C.V.) fue de 8.54 %, lo que indica que los datos evaluados están dentro de los parámetros estadísticos de aceptación.

3.2 Contaminación por bacterias

Realizando el análisis de varianza, sobre la contaminación por bacterias que se muestra en el Cuadro 2, se establece que no existen diferencias estadísticas en el establecimiento de seis accesiones de papa amarga con tres concentraciones de desinfectante.

Cuadro 2. Análisis de varianza para porcentaje de contaminación por bacterias

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
A	5	0.18	0.36	0.87	0.4999 N.S.
B	2	0.02	0.01	0.27	0.7615 N.S.
A*B	10	1.00	0.10	2.45	0.8892 N.S.
Error	252	10.27	0.04		
Total	269	11.46			

$$CV = 19.33\%$$

Por otra parte, el coeficiente de variación (C.V.) fue de 19.33%, lo que indica que los datos evaluados están dentro de los parámetros estadísticos de aceptación para el tipo de experimento realizado.

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos in vitro se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, así como por las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante (Mroginski & Roca 1991).

3.3 Fenolización

Durante la evaluación de la primera semana y a los 28 días no se presencié fenolización en los cultivos.

3.4 Oxidación

Durante la evaluación de la primera semana y después de los 28 días no se presenció oxidación en los cultivos.

3.5 Necrosis

Realizando el análisis de varianza, sobre la presencia de necrosis que se muestra en el Cuadro 3, se establece que existen diferencias estadísticas significativas respecto a las seis accesiones estudiadas y en relación a los tres niveles de concentración de desinfectante no existen diferencias estadísticas en el establecimiento de papa amarga.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la necrosis

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
A	5	0.95	0.19	2.35	0.0413 *
B	2	0.05	0.03	0.32	0.7263 N.S.
A*B	10	1.28	0.13	0.5	0.1119 N.S.
Error	252	20.40	0.08		
Total	269	2.69			

CV= 26.04%

La prueba de Duncan nos muestra que se presentó mayor necrosis en las accesiones de papa amarga PA-003 y PA-010 y en las accesiones donde se identificó menor cantidad de plantas necróticas fueron en las accesiones PA-002 y PA-0014 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Agrupamiento Duncan

Accesión	Media	Duncan
PA-003	1.18	A
PA-010	1.16	A
PA-013	1.09	AB
PA-012	1.09	AB
PA002	1.02	B
PA-014	1.02	B

3.6 Engrosamiento de tallo

El análisis de varianza, sobre engrosamiento de tallo que se muestra en el Cuadro 5, y se establece que existen diferencias estadísticas en relación al factor de variedad en el establecimiento de seis accesiones de papa amarga con tres concentraciones de desinfectante, mientras que

en relación a la concentración de desinfectante e interacción no existen diferencias.

Cuadro 5. Análisis de varianza para engrosamiento de tallo

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
A	5	2.76	0.56	2.257	0.0478 *
B	2	0.10	0.05	0.32	0.8217 N.S.
A*B	10	1.55	0.15	0.5	0.7859 N.S.
Error	252	61.73	0.24		
Total	269	66.16			

CV= 31.52%

Por otra parte, el coeficiente de variación (C.V.) fue de 31.52 %, lo que indica que los datos evaluados no son confiables, ya que no están dentro de los parámetros estadísticos de aceptación para el tipo de experimento realizado.

La prueba de Duncan nos muestra que se presentó mayor engrosamiento de tallo en las accesiones de papa amarga PA-013 y PA-004 (valores cercanos a 2) y en las accesiones donde se identificó menor engrosamiento de tallo en las accesiones PA-002 y PA-0010 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Agrupamiento Duncan

Accesión	Media	Duncan
PA-013	1.76	A
PA-004	1.60	AB
PA-003	1.58	AB
PA-014	1.58	AB
PA-002	1.47	B
PA-010	1.44	B

3.7 Porcentaje de establecimiento

Posterior a la determinación de vitroplantas contaminadas por hongos, bacterias, con presencia de fenolización, oxidación, necrosis y engrosamiento de tallo se procedió a analizar el porcentaje de establecimiento, encontrándose los siguientes valores:

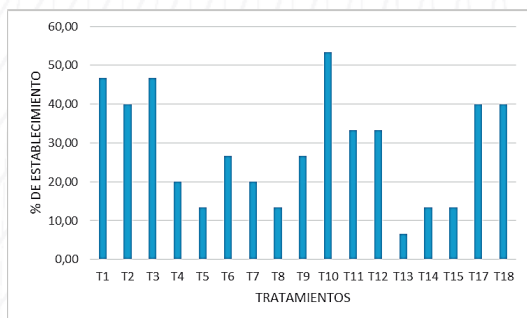


Figura 2. Porcentaje de establecimiento in vitro de los tratamientos

Como se observa en la figura 2, el tratamiento con mayor porcentaje de establecimiento fue el de la accesión PA-012 con NaClO al 0,5% durante 15 minutos, mientras el tratamiento con menor porcentaje de establecimiento fue el tratamiento 13 que corresponde a la accesión PA-013 con NaClO al 0,5% por 15 minutos.

La concentración y el tiempo de exposición al desinfectante están relacionados tanto a la especie como al tipo de explante, siendo el hipoclorito de sodio uno de los más utilizados, ya que se considera gentil con el tejido vegetal y no con los microorganismos contaminantes, además, es de fácil adquisición y bajo costo en el mercado. Araya (2000), menciona que a mayor concentración y tiempo de exposición al NaOCl, menor porcentaje de contaminación. Asimismo (Ramírez-Villalobos et al. 2004), menciona que a altas concentraciones de NaClO y/o tiempos muy prolongados (mayores a 20 min) inhiben el crecimiento del explante, dependiendo el tipo de especies.

4. Conclusiones

A partir de la determinación del porcentaje de establecimiento, descartando la contaminación por hongos y bacterias y la presencia de fenolización, necrosis, oxidación y engrosamiento de tallo en los tratamientos de la introducción a in vitro de seis accesiones de papa amarga con tres concentraciones de desinfectante en el laboratorio de biotecnología-UPEA, se realizó los siguientes protocolos de introducción:

Explante: Brotes de tubérculo

Lavado: Con agua de grifo y una gota de detergente

Desinfección con alcohol (OH): Un minuto al 70% de OH

Desinfección con Hipoclorito de sodio (NaClO): De acuerdo a la siguiente tabla.

Lavado: Tres veces con agua destilada estéril dentro la cámara de flujo laminar

Siembra: 1-3 mm del ápice de los brotes

Incubación: En la cámara de crecimiento por 16hrs luz y 8hrs de oscuridad, 18-22°C y 2500-3000 Lux, por 30 – 45 días.

ACCESIÓN	NaClO
PA002	5 minutos al 1,5% de NaOCl
PA-003	5 minutos al 1,5% de NaOCl
PA-010	5 minutos al 1,5% de NaOCl
PA-012	15 minutos al 0,5% de NaOCl
PA-013	5 minutos al 1,5% de NaOCl
PA-014	10 minutos al 1,0% de NaOCl

5. Agradecimientos

Al Banco de Germoplasma de Tubérculos Andinos y al laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Ingeniería Agronómica por facilitar la realización de la presente investigación.

6. Referencias bibliográficas

Araya, E. 2000. Establecimiento y multiplicación in vitro de jaúl (*Alnus acuminata*) [tesis licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología.

Canqui, F.; Morales, E. 2008. Conocimiento local en el cultivo de la papa. Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación COSUDE.

Estrada, N. 1992. La papa amarga: Importancia genética de las papa amargas. Ed. J. Rea y J.J. Vacher. La paz, Bolivia. 11-14.

Huanco, V. 1991. Potencial de las papas amargas en el altiplano de Puno, Perú. Ed. J. Rea y J.J. Vacher. Puno, Perú. 25-26.

Mroginsky, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales in vitro. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Ramírez, M; Lindorf H, García E. 2004. Cambios morfo anatómicos del ápice del vástago en banano CIEN BTA-03 y su parental Williams bajo condiciones in vitro. Rev Fac Agron (LUZ).

Ramos Pardo, P. 2012. Evaluación de la variabilidad genética en progenies por semilla botánica en papa amarga choquepito (*Solanum curtilobum*) en Quipaquipani provincia Ingavi, La Paz. Tesis Ing. Agr. La Paz, Bolivia. UMSA. 117