

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto del Sitosterol, Putrecina y Antioxidantes en la  
criopreservación de ápices meristemáticos de “Papa”  
*Solanum spp L.***

Tesis para optar el Título Profesional de licenciada en biología.

Patricia Maria Canepa Middlebrook.

LIMA-PERU

2011

## *AGRADECIMIENTO*

En primera instancia al PhD. David Tay, jefe de la División de Conservación y Caracterización de Recursos Genéticos y a la Licenciada Ana Panta Asistente de Investigación de la División de Conservación y Caracterización de Recursos Genéticos del Centro Internacional de la Papa (CIP) y asesores de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Al profesor Mauro Quiñones por a su vez ser asesor universitario por orientarme y ayudarme a desarrollar y sustentar la presente tesis.

A todos mis amigos y personal del Laboratorio de Conservación y Caracterización de Recursos Genéticos por ayudarme en todo momento y a su vez crear un ambiente agradable de amistad y confraternidad.

A Rosalba, Wendy y Lynn por sus consejos y ayuda en la realización de la parte experimental de la presente tesis.

A mi familia por brindarme su total apoyo, confianza y cariño. De manera especial a mi mamá que es el soporte de mi vida y a mi papá que lo sigue siendo desde el cielo.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS .....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
2.1.1 <i>Taxonomía</i> .....	13
2.1 GENERALIDADES .....	13
2.1.2 <i>Importancia</i> .....	13
2.1.3. <i>Variedades</i> .....	14
2.1.3.1 <i>Ccompis: S. tuberosum subsp andigena var. chiar-imilla f. ccompis Ochoa</i> .....	14
2.1.3.2 <i>Tacna</i> .....	15
2.2 CRIOPRESERVACIÓN.....	16
2.3. SITOSTEROL .....	17
2.4. PUTRECINA .....	19
2.5. ANTIOXIDANTES.....	19
2.5.1. <i>Ácido Ascórbico</i> .....	21
2.5.2. <i>Glutación</i> .....	22
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1.1 <i>Material Biológico</i> .....	24
3.1 MATERIALES .....	24
3.1.2 <i>Reactivos</i> .....	24
3.1.3 <i>Material de Laboratorio</i> .....	24
3.1.4 <i>Equipos de Laboratorio</i> .....	24
3.1.5 <i>Medios de cultivo</i> .....	25
3.1.5.1 <i>Medio de Propagación (MSA):</i> .....	25
3.1.5.2 <i>Medio de Regeneración (MR):</i> .....	25
3.2.1. <i>Multiplicación in vitro del material vegetal</i> .....	25
3.2 METODOLOGÍA.....	25
3.2.2. <i>Establecimiento del medio de cultivo enriquecido con Sitosterol y Putrecina</i> .....	26

3.2.2.1 Reparación de Medio Sitosterol A (Medio A):.....	26
3.2.2.2 Preparación de Medio Sitosterol B (Medio B):.....	26
3.2.3. <i>Criopreservación</i> .....	27
3.2.3.1 Escisión de ápices meristemáticos:.....	27
3.2.3.2 Osmoprotección y vitrificación con PVS2.....	27
3.2.3.3 Congelamiento.....	27
3.2.3.4 Descongelamiento y cultivo post-criopreservación .....	28
3.2.4. <i>Aplicación de agentes antioxidantes: ácido ascórbico y glutatión reductasa, en el medio de post congelamiento</i> .....	28
3.2.5 <i>Evaluación de sobrevivencia y recuperación</i> .....	29
3.2.6 <i>Análisis estadístico</i> .....	29
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. EFECTO DEL SITOSTEROL.....	30
4.1.2. <i>Efecto del Sitosterol Medio B</i> .....	30
4.1.1. <i>Efecto del Sitosterol Medio A</i> .....	30
4.2. EFECTO DE LA PUTRECINA.....	31
4.3. EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	32
4.4 EFECTO DEL GLUTATIÓN REDUCTASA .....	32
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
5.1. EFECTO DEL SITOSTEROL.....	34
5.2. EFECTO DE LA PUTRECINA .....	35
5.3. EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO.....	36
5.4. EFECTO DEL GLUTATIÓN REDUCTASA .....	37
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>IX. ANEXOS .....</b>	<b>45</b>
9.1 TABLAS .....	45
9.2 GRÁFICOS.....	57
9.3 FIGURAS.....	67

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1 MEDIO MURASHIGE & SKOOG (MS) .....	45
TABLA N°2 MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE PLANTAS MADRE (MSAP) .....	46
TABLA N° 3 MEDIO DE CULTIVO PARA PROPAGACIÓN (MSA) .....	46
TABLA N° 4 MEDIO DE PRE – CULTIVO (MSA – 25) .....	47
TABLA N°5 MEDIO DE POST – CULTIVO I (MSA – 0.3) .....	47
TABLA N°6 MEDIO DE POST – CULTIVO II (MSA – 0.1) .....	48
TABLA N°7 CONCENTRACIÓN DE LOUDING SOLUTION (LS) .....	48
TABLA N°8 CONCENTRACIÓN DE PVS2.....	49
TABLA N°9 CONCENTRACIÓN DE RECOVERY SOLUTION (RS) .....	49
TABLA N°10 CONCENTRACIÓN DE QUÍMICOS .....	50
TABLA N° 11 RESULTADOS DE SITOSTEROL EN MEDIO A .....	50
TABLA N° 12 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	51
TABLA N° 13 RESULTADO DE LA INTERACCIÓN DE SITOSTEROL EN MEDIO B CON LAS VARIEDADES DE PAPA .....	52
TABLA N° 14 RESULTADO DE PUTRECINA EN MEDIO MS .....	53
TABLA N° 15 RESULTADOS DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN MEDIO MS.....	54
TABLA N° 16 RESULTADO DE GLUTATIÓN REDUCTASA EN MEDIO MS.....	55
TABLA N° 17 RESULTADO DE LA INTERACCIÓN DE GLUTATIÓN REDUCTASA CON LAS VARIEDADES DE PAPA .....	56

# ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO A .....	57
GRÁFICO N° 2 EFECTO DEL SITOSTEROL EN MEDIO A EN LAS VARIEDADES DE PAPA .....	58
GRÁFICO N° 3 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	59
GRÁFICO N° 4 EFECTO DEL SITOSTEROL EN MEDIO B EN LAS VARIEDADES DE PAPA .....	60
GRÁFICO N° 5 RESULTADO DE PUTRESCINA.....	61
GRÁFICO N° 6 EFECTO DE PUTRESCINA EN LAS VARIEDADES DE PAPA .....	62
GRÁFICO N° 7 RESULTADO DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	63
GRÁFICO N° 8 EFECTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LAS VARIEDADES DE PAPA .....	64
GRÁFICO N° 9 RESULTADO DE GLUTATIÓN REDUCTASA .....	65
GRÁFICO N° 10 EFECTO DE GLUTATIÓN REDUCTASA EN LAS VARIEDADES DE PAPA .....	66
FIGURA N° 1 PEDIGRÍ VARIEDAD TACNA.....	67
FIGURA N° 2 PEDIGRÍ VARIEDAD CCOMPIS.....	68
FIGURA N° 3 MUESTRAS CONTROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE LA VARIEDAD CCOMPIS.....	69
FIGURA N° 4 MUESTRA CONTROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE LA VARIEDAD TACNA .....	69
FIGURA N° 5 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 27 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	70
FIGURA N° 6 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 54 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	70
FIGURA N° 7 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 108 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	71
FIGURA N° 8 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 161 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	71
FIGURA N° 9 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 27 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	72
FIGURA N° 10 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 54 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	72
FIGURA N° 11 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 108 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	73
FIGURA N° 12 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 161 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A.....	73
FIGURA N° 13 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 27 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B.....	74

FIGURA Nº 14 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 54 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	74
FIGURA Nº 15 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 108 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	75
FIGURA Nº 16 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 161 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	75
FIGURA Nº 17 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 27 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	76
FIGURA Nº 18 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 54 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	76
FIGURA Nº 19 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 108 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	77
FIGURA Nº 20 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 161 $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B .....	77
FIGURA Nº 21 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 125 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	78
FIGURA Nº 22 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 250 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	78
FIGURA Nº 23 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 375 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	79
FIGURA Nº 24 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 125 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	79
FIGURA Nº 25 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 250 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	80
FIGURA Nº 26 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 375 $\mu$ M DE PUTRESCINA .....	80
FIGURA Nº 27 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 50 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	81
FIGURA Nº 28 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 100 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	81
FIGURA Nº 29 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 150 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	82
FIGURA Nº 30 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 50 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	82
FIGURA Nº 31 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 100 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	83
FIGURA Nº 32 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 150 MG/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	83
FIGURA Nº 33 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 5 MG/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA .....	84
FIGURA Nº 34 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 10 MG/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA .....	84
FIGURA Nº 35 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA CON 15 MG/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA .....	85

FIGURA N° 36 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 5 MG/L DE GLUTATIÓN	
REDUCTASA.....	85
FIGURA N° 37 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 10 MG/L DE GLUTATIÓN	
REDUCTASA.....	86
FIGURA N° 38 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON 15 MG/L DE GLUTATIÓN	
REDUCTASA.....	86

## RESUMEN

Con el fin de mejorar la sobrevivencia y recuperación de ápices meristemáticos de papa criopreservados de las variedades *S. tuberosum* subsp. *andigenum* cvs. 'Ccompis' y la variedad 'Tacna', un híbrido múltiple de especies cultivadas y una especie silvestres, se probó 3 dosis de Putrecina y 4 dosis de sitosterol, estos adicionados en el medio de cultivo donante de ápices meristemáticos y 3 dosis de dos antioxidantes: Ácido ascórbico y glutatión adicionados en el cultivo post-congelamiento. Los ápices meristemáticos fueron sometidos a crio- procesos con el método PVS2. El experimento con putrecina la dosis 250 uM mostró tener buenos resultados, en cuanto al experimento con sitosterol obtuvo mejores resultados con la utilización del Medio A que con el Medio B, en especial con la dosis de 27 uM. El ácido ascórbico demostró efectos negativos significativos en la sobrevivencia y recuperación de plántulas en los dos cultivares. Mientras que con glutatión la dosis de 15 mg/L resultó ser favorable, donde la variedad "Ccompis" tuvo una mejor sobrevivencia y recuperación de plántulas que con la variedad Tacna.

## ABSTRACT

With the purpose of improving the survival and recovery of potato shoot tips criopreserved in the varieties *S. tuberosum* subsp. *andigenum* cvs. 'Ccompis' and 'Tacna', a multiple hybrid from cultivated and a wild species, it was tested 3 doses of putrescine and 4 doses of sitosterol added in the MS medium donator of shoot tips and 3 doses with two antioxidants: Ascorbic acid and glutathione added to the post thawing medium. Shoot tips were subjected to the cryo-process with the PVS2 droplet vitrification method. Results with putrescine the doses 250 uM showed good results, with sitosterol results where better with A Medium than with B Medium, especially with 27 uM doses. The ascorbic acid showed a significant negative effect on survival and recovery of shoot tips of the two cultivars. With glutathione the dose of 15mg/L showed to be favorable, where the variety 'Ccompis' had better survival and recovery of the plantlets than with the variety 'Tacna'.

# I. INTRODUCCIÓN

La papa, cuya parte comestible es el tubérculo, es el cuarto cultivo más importante del mundo, solo detrás del trigo, maíz y arroz. Este cultivo posee diferentes propiedades alimenticias, como vitamina C y complejo B, lo que ha hecho de este cultivo uno de los más importantes para la alimentación. Además la papa es un cultivo milenario y originario de la zona andina, específicamente del altiplano peruano-boliviano. Por todas estas características es que es de suma importancia conservar los recursos genéticos de este tubérculo, como parte de la riqueza del Perú, zonas andinas, y de toda la humanidad.

La criopreservación en nitrógeno líquido (-196°C) es una técnica que tiene gran potencial para la conservación a largo plazo de recursos genéticos, ya que el material puede ser almacenado en forma segura por un periodo ilimitado. Los métodos desarrollados están demostrando que permiten la conservación segura de los recursos filogenéticos. La investigación actual en criogenia está dirigida al desarrollo de métodos mejorados simples y confiables, principalmente basados en las técnicas de vitrificación, deshidratación-encapsulación y encapsulación-vitrificación, la técnica de vitrificación, la cual va ser utilizada en la presente tesis, se basa en la transformación de líquido a vidrio, utilizando soluciones crioprotectoras que se transforman a vidrio si son enfriadas suficientemente rápido para prevenir la formación de cristales de hielo; esto se logra deshidratando la especie al máximo en soluciones concentradas antes de ser introducidas al nitrógeno líquido.

El Centro Internacional de la Papa (CIP) mantiene la colección de recursos genéticos de papa más grande del mundo y dentro de su estrategia de conservación a largo plazo a incluido la criopreservación. El método para crioconservar ápices meristemáticos de papa que actualmente se aplica en el CIP, utiliza la solución de vitrificación llamada "PVS2", por su nominación en inglés Plan Vitrification Solution 2 (30% glicerol (w/v), 15% etinol glicol (w/v), 15% DMSO (w/v)

en medio de cultivo con 0.4M de sucrosa), obteniendo una tasa promedio de recuperación 30% (Gonzalez-Arno et. al., 2008).

En el CIP se ha observado que existe una pérdida o muerte de ápices meristemáticos durante el proceso de cultivo post- congelamiento para la recuperación de plántulas en aproximadamente el 10% de entradas probadas (comunicación personal, Ana Panta, CIP). Los signos físicos observados en los ápices meristemáticos criopreservados que mueren son necrosis y muerte de tejido. Se asume que tal problema ocurre por procesos oxidativos. Así también mediante ensayos preliminares se ha encontrado indicativos que sitosterol y putrecina podrían incrementar la tasa de recuperación cuando son aplicados en el cultivo *in vitro* de las plantas donantes de ápices meristemáticos.

Es por eso que la presente investigación realizó dos experimentos para evaluar si el uso de sitosterol, putrecina, ácido ascórbico y glutatión reductasa incrementan la tasa de sobrevivencia y recuperación de ápices meristemáticos crioconservados de dos variedades de papa. El primer experimento estuvo dirigido a evaluar el efecto de sitosterol y putrecina, aplicados en el pre-cultivo de las plántulas donantes de explantes a criopreservar. El segundo experimento consideró como objetivo evaluar el efecto de 2 agentes antioxidantes, ácido ascórbico y glutatión reductasa, aplicados en el cultivo post-descongelamiento.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Taxonomía

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Solanales
Familia	:	Solanaceae
Género	:	<i>Solanum</i> L., 1753

Designación dada por Linneo (CONABIO, 2008)

#### 2.1.2 Importancia

El género *Solanum* L. (Linneo, 1753) se considera como el más importante de la familia Solanaceae. Su distribución geográfica es mundial; se encuentra preferentemente en regiones tropicales y subtropicales, concentradas en América tropical y áreas templadas. Son especies herbáceas o arbustivas, a menudo revestidas de espinas, con frutos comestibles, venenosos y otros tallos subterráneos o tubérculos (Ochoa, 1999).

La planta de *Solanum tuberosum* L. o "papa" también es importante por tener una extraordinaria adaptación a condiciones muy variadas de clima y suelos, y por tener una gran variedad de tubérculos de múltiples colores, formas y sabores. Este tubérculo puede ser utilizado por los agricultores como semilla asexual y como una forma de conservación del genoma. Su uso tiene la ventaja de producir plantas con mejor crecimiento por tener una fuente continua de energía, reguladores de crecimiento y además por generar plantas más nutritivas (Borda *et al.*, 2001).

La domesticación por los humanos y la selección como alimento le dio características adecuadas para la producción en campos, procesamiento y mercadeo; como resultado la papa se ha convertido en un cultivo excepcional rico en carbohidratos, además de gran calidad de proteínas y un nivel significativo de vitamina C. Menos conocidos son los contenidos de carotenoides y componentes fenólicos encontrados en la papa, los cuales son potentes antioxidantes (Brown, 2005).

### 2.1.3. Variedades

#### 2.1.3.1 Ccompis: *S. tuberosum* subsp *andigena* var. *chiar-imilla* f. *ccompis* Ochoa.

*Código experimental: CIP 700921*

*Pedigree:* La variedad *S. tuberosum subsp andigena* es proveniente de la unión de las variedades *S. sporsipilum* y *S. stenotomum*, unas de las variedades más antiguas del país. (Figura N° 1).

##### *Características de la planta:*

Planta vigorosa. Tallos verdes claros angostamente alados. Hojas verdes claras, poco divididas. Pedúnculos de 10 cm de largo; pedicelos aproximadamente de 19-22 mm de largo, pedicelo superior corto, de 3-4 mm, el inferior de 15 mm. Cáliz de 7.5-8.5 mm de largo con lóbulos súbitamente angostados en acúmenes cortos, de 1.5 mm. Corola blanca, de 3.0-3.5 cm de diám., estrella

interna verde amarillenta. Columna de anteras tronco cónica; anteras de 5.5 mm de largo. Estilo de 10-11 mm de largo.

##### *Características del tubérculo:*

Tubérculos redondos monticulosos (tuberosados), periderma usualmente rosado a rosado violáceo claro con ojos y cejas de tonos rosados más oscuros, ocasionalmente como en el caso de los morfotipos llamados *alkka-imilla* o *alkka-ccompis*, con halos

blanquecinos alrededor de los ojos, ojos profundos, brotes rosados violáceos claros, carne blanca a blanca marfileña.

*Distribución:*

La f. Ccompis está ampliamente distribuida en el sur del Perú y Bolivia. En el Perú, se le conoce más con el nombre de Ccompis. Sin embargo, en el altiplano de Bolivia esta papa de flores blancas y tubérculos rosados es conocida con distintos nombre tales como *Imilla Rosada*, o también *Yuraq Imilla*, *Imilla Blanca* o *Janck'o Imilla*.

### **2.1.3.2 Tacna**

*Código experimental:* CIP 390478.9.

*Pedigree:*

Serrana x XY.4. La variedad argentina serrana, utilizada como progenitor femenino, se caracteriza por su alto rendimiento y resistencia al virus del enrollamiento de la hoja (PLVR). El progenitor masculino XY.4 es un clon mejorado del departamento de Genética y Mejoramiento del Centro Internacional de la Papa (CIP). Su principal atributo es su gran tolerancia a los virus PVX y PVY y su precocidad (80-90 días). (Figura N° 2)

*Características de la planta:*

Planta de buen vigor. Con una altura de 50 cm., tallos entre 4-5 por planta. Hojas verdes claro, con foliolos anchos, pubescencia mediana. Flores de color blanco, floración abundante, bayas muy escasas, brotes verdes sin pigmentación. Con una producción de tubérculos media, entre 8-10 por planta. Periodo de patencia media (8-10 semanas). Consta de un Periodo vegetativo precoz, 90 días.

*Características del tubérculo:*

El tubérculo consta de 20.5% de materia seca, 0.05% de azúcar reductor. Produce hojuelas buenas con buen color (2.7) y una calidad de fritura buena (2.7).

*Resistencia a plagas y enfermedades:*

Inmune a los virus X y Y, muy buena resistencia a PLRV, moderadamente resistente al nematodo del nudo de la raíz, *Meloydogyne incognita*, y algo tolerante a la marchitez bacteriana.

*Resistencia a estreses abióticos:*

Resistencia a la salinidad alta (6-10 mmh). A sequía media (riego restringido). A calor alto (Prom.23-25°C). A toxicidad de boro media (5-10 ppm).

*Adaptación:*

Esta variedad se adapta a las condiciones de la costa central y sur, ya la zona sub-tropical media.

*Época de siembra:*

Su tolerancia al calor la hace apta para cultivos en primavera, verano y otoño. Se recomienda sembrar a principios de setiembre (primavera) y a principios de marzo (otoño).

## **2.2 Criopreservación**

El mantenimiento del germoplasma de papa en campo, implica gran consumo de tiempo, trabajo, y espacio; Y conlleva riesgo de pérdida por enfermedades y estrés ambiental. La conservación de papa *in vitro* es menos costosa, pero presenta riesgos de variaciones somaclonales e inestabilidad genética. Por eso la criopreservación es el método de conservación a largo plazo

que requiere un mínimo espacio y mantiene los tejidos genéticamente estables, es la opción más promisoría para guardar germoplasma de papa de forma segura y eficiente. (Hirai y Sakai, 2000).

Recientemente se han desarrollado procedimientos de criopreservación simple y confiable, como son la vitrificación, encapsulación-deshidratación y encapsulación-vitrificación. Con estos procedimientos se han criopreservado un gran número de especies o cultivares. El método de vitrificación, con o sin encapsulación ha comprobado ser más efectivo en producir un porcentaje mayor de sobrevivencia y rápida recuperación que otros procedimientos de criopreservación. Más de la mitad de una década, el método de vitrificación se ha convertido en el método preferido para la criopreservación de más de 160 especies y cultivares que han sido exitosamente criopreservados (Hirai y Sakai, 2003).

Durante la criopreservación los explantes sufren diferentes daños que pueden ser muy perjudiciales para estos, es por eso que se realizan diferentes mecanismos dentro de la criopreservación para poder aumentar el porcentaje de recuperación. Mediante ensayos preliminares, se ha determinado la presencia de diferentes compuestos químicos que aumentan al ser criopreservados, entre estos se encuentra la Putrecina y el Sitosterol, es por eso que se presume que estos químicos tienen un rol importante en el momento de la recuperación de los explantes post-criopreservados (Panta *et al.*, 2009).

### **2.3. Sitosterol**

Todos los protocolos de crioconservación son desarrollados a través de “prueba y error” y dependen de la resistencia natural de la especie al congelamiento, el tamaño y tipo del explante y contenido de agua de este. Por lo que el cuidado durante el protocolo es de evitar la cristalización intracelular durante el proceso de congelamiento, el cual puede causar daños fisiológicos al tejido. Los mecanismos de tolerancia dependen en la estabilización de la membrana (a través de cambios en la composición lipídica, acumulación de

azúcar y la producción de polipéptidos), la inducción de mecanismos antioxidantes, incremento de los niveles de azúcar en los espacios apoplásticos y la transcripción de genes que codifiquen chaperones moleculares. Se ha encontrado un incremento de los niveles de Stigmasterol/Sitosterol en la proliferación de meristemas de banana crioconservados como resultado del pretratamiento con sucrosa, el incremento de este parece estar relacionado con la habilidad de resistencia a la crioconservación: El incremento parece ser menor en los explantes que tuvieron una mejor sobrevivencia y mayor en los explantes que tuvieron una mala sobrevivencia. (Zhu *et al.*, 2006).

El Sitosterol es uno de los fitosteroles que se encuentra en mayor cantidad en las plantas junto con campesterol (siendo el 95% del total de los fitosteroles de la planta). El  $\beta$ -Sitosterol tiene una estructura similar al colesterol donde se substituye un etil en la posición 24 (McCarthy *et al.*, 2005). La vía biosintética de la mayoría de los fitosteroles se conocen muy bien, pero la función y la necesidad de estos esteroides en las plantas todavía no está muy bien definido, el rol primario de los esteroides en las plantas es en el metabolismo y composición de las membranas, especialmente en tejidos que están en constante división celular. Se ha investigado que en los cultivos *in vitro* las composiciones de los esteroides se alteran significativamente. En cultivos con benziladenina (BA) el stigmasterol y el sitosterol se producen en grandes cantidades en los explantes que se regeneraron, mientras que en cultivos con Acido Indol Acético (IAA) se incrementó la cantidad de campesterol en las raíces, los resultados sugieren que los reguladores de crecimientos que se utilizan *in vitro*, especialmente IAA influyen directamente en el metabolismo de los esteroides (Bhatt y Bhatt, 1984). Estudios preliminares realizados en el Centro Internacional de la Papa, han demostrado que los ápices meristemáticos que fueron sometidos a criopreservación muestran un índice alto de producción de esteroides, en especial sitosterol (Ana Panta, comunicación personal).

## 2.4. Putrecina

Las poliaminas (PA) son un grupo de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se presentan en las células de todos los seres vivos. Por su carácter policatiónico (cargadas positivamente) pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas (cargadas negativamente), tales como algunas proteínas, los fosfolípidos, las pectinas, el ADN y el ARN, entre otras. Debido a estas características, las PA afectan la actividad celular, y como consecuencia están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos que van desde el crecimiento y desarrollo vegetal hasta la protección contra el estrés biótico y abiótico. Las principales PA son putrecina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Mendoza y Rocha, 2002).

Para incrementar la embriogénesis somática de diferentes líneas de algodón (*Gossypium hirsutum L.*) del germoplasma de Gergia y Pee Dee se cultivó estas líneas en medios de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de Putrecina (0,0.25, 0.50 mg l<sup>-1</sup>), el mejor resultado se obtuvo con 0.5 mg l<sup>-1</sup> de putrecina en casi todas los tratamientos y líneas de algodón que se probaron, dando como conclusión que la putrecina ayuda en la embriogénesis somática. (Sakhanokho, 2005).

## 2.5. Antioxidantes

La presencia de oxígeno es fundamental para los componentes del metabolismo celular. Sin embargo, cualquier situación en la que resulta un repentino sobreconsumo de oxígeno puede desencadenar la producción de radicales libres (RL), también conocidos como ROS, por sus siglas en ingles "Reactive Oxygen Species ". La producción de RL se origina en las mitocondrias en la que estos evaden enzimas o por un error en el proceso oxidativo (Kerksick y Willoughby, 2005). Estos pueden ser: Radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicales hidroxilo (OH), diferentes radicales lípidos (L) y peróxidos (LOOH). Las fuentes celulares RL son diferentes, pero la principal es la generada por el proceso respiratorio de la mitocondria que produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> generando

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Durante el proceso la producción de radicales se da por la reacción Haber – Weiss, la cual genera OH que al chocar con moléculas de lípidos en las membranas se da una reoxidación. Físicamente las moléculas activas (como óxido nítrico-NO) pueden también reaccionar con los RL, si se da una reacción entre O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO conllevará un peroxinitrato (ONOO<sup>-</sup>) en las células las cuales son moléculas citotóxicas, también llamadas RL de nitrógeno (RLN). Los RLN provocan modificaciones en las moléculas y pueden inducir estrés nitrogenado (Blagojevic, 2007).

Los organismos han desarrollado sistemas de defensas antioxidativo (DA), produciendo enzimas y moléculas de bajo peso molecular los cuales tienen el rol de neutralizar y/o suprimir los daños oxidativos en la célula, manteniendo la reacción redox estable. Principalmente los DA consisten en enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión reductasa (GR) y antioxidantes no enzimáticos: Glutatión (GSH) y ácido ascórbico (AsA). SOD convierte O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CAT descompone el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. GSH-Px realiza lo mismo, pero convierte LOOH a LOH, usando GSH como cofactor de reducción. Estas reacciones utilizan GSH celular y generan su forma oxidativa GSSG (Glutatión oxidada). Sin embargo, GSSG puede ser reducido por GR, y esta reacción ser usada por NADPH como cofactor reductante. La acción de un DA requiere de una equivalencia redox. En otras palabras, el proceso de antioxidantes en las células consume el GSH y/o NADPH. La baja temperatura provoca respuestas fisiológicas relacionadas con un aumento de consumo de oxígeno e induce cambios en la producción de energía (aumento de calor intracelular) y subsecuentemente la producción de RL. Mientras que en la periferia celular se da una disminución del metabolismo y respiración, con lo que no hay mucha producción de RL (Blagojevic, 2007).

Las plantas poseen una cantidad de antioxidantes, como glutatión (GDH), ácido ascórbico (vitamina C), componentes fenólicos isoflavónicos, α tocoferol (vitamina E) y carotenoides, incluyendo xantofilas. La forma reducida de estos componentes, junto con las enzimas antioxidantes, puede proteger a la célula de

ser atacada por radicales libres y otros productos de reacción oxidativa (Wang y Deng, 2004)

Uno de los principales antioxidantes es el ácido ascórbico, en general se conocen tres tipos principales de actividades biológicas para el L-Ácido Ascórbico (L-AA): Como co-factor enzimático, eliminador de radicales y como donador/receptor en el transporte de electrones. Como antioxidante, tanto en plantas como en animales el L-AA interactúa enzimáticamente y no-enzimáticamente con los daños producidos por radicales oxígeno y sus derivados. La habilidad del L-AA de interactuar con los RL implica la modulación de L-AA en los procesos como lignificación, división celular y respuestas hipersensitivas. La importancia biológica del comportamiento como antioxidante del L-AA es la que a diferencia de otros antioxidantes de bajo peso molecular ( $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, carotenoides, flavonoides, etc.), es que es parcialmente electronegativo, este puede donar electrones a una gran cantidad de sustratos. Una de las más importantes actividades como antioxidante no enzimático, está implicado en la regeneración del radical lipofílico  $\alpha$ -tocoferol asociado con la membrana (Davey, 2000).

### 2.5.1. Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico ha sido incluido en algunos medios de cultivo y se utiliza como un ingrediente no esencial de estos. Varias investigaciones han incluido pequeñas cantidades (0.1 – 1.0 mg/L) sin tener evidencia clara de ser beneficioso. Respuestas definitivas, sin embargo, han sido medidas en la presencia de 0.06-0.8 mM (10-141 mg/L). Se ha notado que 0.1 mM de ácido ascórbico estimula la síntesis de DNA en meristemos de raíz y parece acortar el ciclo celular, especialmente en la fase G1. La adición exógena de ácido ascórbico al tejido de plantas se ha descrito que incrementa la actividad metabólica y acelera la liberación de azúcar. Se obtuvo una gran cantidad de azúcar libre en callos viejos de *Nicotiana* durante estados iniciales del cultivo con ácido ascórbico y la adición de 0.4-0.8 mM de ascorbato a medio de formación de ápices, incrementa la

producción de ápices de viejos y jóvenes en callos de *Nicotiana tabacum* (George, 1993).

Glutación reductasa es otro antioxidante que ha sido bastante estudiado. Esto es por ser endógenamente sintetizado en todo el cuerpo y básicamente se encuentra en todas las células, algunas veces en altas concentraciones. Existen investigaciones en las que se describen muchos roles en las que el glutación es usado, como antioxidante, detoxificante de electrofílicos xenobióticos, modulación redox, transporte y guardado de cisteína, regulación de la proliferación celular, síntesis de la síntesis de deoxiribonucleotidos, regulación de respuestas inmunológicas, regulación de leucotrieno y metabolismo de prostaglandinas. (Kerksick y Willoughby, 2005).

### **2.5.2. Glutación**

El glutación, ya sea como GSH o como GSSH (glutación disulfóxido; óxido de glutación) es considerado como un componente de los antioxidantes defensa en muchos de los organismos aeróbicos, incluyendo plantas. Sin embargo, los niveles de GSH intracelular han sido observados que son significativamente reducidos durante la criopreservación. En el reporte se investigó si es que la adicción de glutación exógeno puede incrementar la sobrevivencia de ápices meristemáticos de citrus criopreservados; utilizando el mejor protocolo de criopreservación se estableció que para "439" tangelo la mejor sobrevivencia de ápices meristemáticos se dio cuando fue pre cultivado por 3 días en medio BPM suplementado con 40 mg/L de GSH, expuestos a la solución LS (Loading Solution) y vitrificadora con 40 mg/L de GSH y luego criopreservados. Después del congelamiento los ápices fueron colocados en el medio de recuperación con 10 mg/L de GSH. Este protocolo fue satisfactoriamente aplicado a otros 12 cítricos dando una sobrevivencia y recuperación de 83,9% y 77,8% respectivamente (Wang y Deng, 2004).

A la vez glutatión tiene el rol de dormancia en las plantas. Se cree que el glutatión reducido mantiene los tiol de las proteínas en un estado reducido, por el que induce la activación de polisomas (la asociación de una molécula de m-RNA con varios ribosomas) y la síntesis de proteínas. Así como la respiración de fosfato pentosa, altos niveles de glutatión reducido asegura una normal disposición de NADPH. Se ha propuesto que el balance entre glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSH) influencia en la extensión celular, crecimiento y división celular. La adición de 2nM de glutatión al medio de cultivo, promueve la división celular de callo en *Brassica* (George, 1993).

# III. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Material Biológico

Se utilizó 2 genotipos representantes de *Solanum sp.*, Comprendiendo 1 variedad nativa: Ccompis (*S. tuberosum subsp andigena*) (código CIP N° 700921) y 1 variedad mejorada: Tacna (código CIP N° 390478.9), conservados en el Banco de Germoplasma del CIP.

### 3.1.2 Reactivos

Sales Murashige y Skoog, 1962 (MS), phytigel, glicina-HCl, myo-inositol, ácido nicótico, piridoxina-HCl, tiamina-HCl, glicerol, sacarosa, etilen glicol, dimetil sulfóxido (DMSO), sitosterol (Sigma), putrecina (Sigma), ácido ascórbico (Sigma), glutatión (Sigma), acetona, Tween 20, etanol 100%, alcohol al 96°, ácido giberélico, Kinetina, agua destilada, nitrógeno líquido.

### 3.1.3 Material de Laboratorio

Placas Petri de plástico, magentas, pinzas, bisturí N° 10 y 11, vaso de precipitación de plástico, vaso de precipitación de vidrio, botellas de vidrio, crioviales, placas Petri de vidrio, papel filtro, algodón, gradillas, pizeta, cronómetro, mechero, pipetas Pasteur, tubos de vidrio N° 25, pipetas de vidrio, bombilla.

### 3.1.4 Equipos de Laboratorio

Cámara Flujo Laminar, estereoscopio, balanza analítica, balanza digital, pH metro, agitador-hornilla, esterilizador, autoclave, horno, tanque de nitrógeno líquido.

### **3.1.5 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo desarrollados se destinaron para la propagación de material *in vitro* y la regeneración de explantes crioconservados de acuerdo a cada experimento.

#### **3.1.5.1 Medio de Propagación (MSA):**

El medio de propagación estuvo compuesto por sales MS (Tabla N° 1), sucrosa 0.07M, Phytigel 0.28 % y complementado con soluciones concentradas de vitaminas a un pH 5.6 (Tabla N° 3). A este medio se le agrego los compuestos químicos a probar, tales como la Putrecina y el Sitosterol. (Tabla N° 10)

#### **3.1.5.2 Medio de Regeneración (MR):**

El medio de regeneración estuvo compuesto por sales MS, diferentes concentraciones de sucrosa (0.3M, 0.1M y 0.07M), 0.28% de Phytigel, soluciones concentradas de vitaminas y 0.04 mg/l de Kinetina, 0.1 mg/l de Acido giberélico (Tabla N° 4, 5, 6) agregados luego de autoclavar y enfriar el medio. Adecuado a un pH de 5.8. A este medio se le agrego los compuestos químicos a probar, tales como el Ácido Ascórbico y el Glutación (Tabla N° 10).

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1. Multiplicación *in vitro* del material vegetal**

Las plántulas se micropropagaron usando segmentos uninodales y cultivadas *in vitro* por 3 semanas en medio MSAP (Tabla N° 2), hasta obtener el número de plántulas necesarias para cada experimento. Se propagaron 20 plántulas por cada envase Magenta, e incubarán a  $18\pm 2$  °C

y fotoperiodo de 16 horas luz. Cada experimento a realizado se repitió 4 veces.

El experimento contó con 4 repeticiones, en las cuales se tuvo diferentes dosis aplicados al medio de cultivo de plantas donantes de ápices meristemáticos, en el caso de sitosterol son cinco tratamientos en la que se evaluó diferentes dosis, el tratamiento 0 (D0) - control, el tratamiento 1(D1) con 27uM (11.15 mg/L), D2 con 54uM (22.3 mg/L), D3 con 108uM (44.6 mg/L) y D4 con 161uM (66.9 mg/L) de sitosterol y de putrecina se contó con 4 tratamientos: D0 (control), D1 con 125uM (20 mg/L), D2 con 250uM (40 mg/L) y D3 con 375uM (60 mg/L) de putrecina.

El sitosterol fue aplicado de dos maneras en el medio de cultivo:

### **3.2.2. Establecimiento del medio de cultivo enriquecido con Sitosterol y Putrecina**

#### **3.2.2.1 Reparación de Medio Sitosterol A (Medio A):**

En la cámara Flujo Laminar, la solución de sitosterol fue disuelta al calor utilizando una hornilla-agitador, con 10 ml/l acetona y 30 ul/l de Tween 20 para luego adicionar la solución al medio MSA estéril que fue dispensado en magentas.

#### **3.2.2.2 Preparación de Medio Sitosterol B (Medio B):**

En este caso, el sitosterol fue disuelto con 3 ml de acetona y 10.45 ml de etanol (90%). Se adicionó 30 ul de la solución en papel filtro de 1 cm<sup>2</sup> estériles y se colocó 4 por cada magenta con medio MSA estéril, todo de forma aséptica en la cámara Flujo Laminar. La putrecina fue agregada al medio de cultivo previo a ser autoclavado.

### **3.2.3. Criopreservación**

Siguiendo el método de Criopreservación utilizado actualmente en el CIP (Panta *et al.*, 2006), se evaluó el efecto de sitosterol y putrecina en los 2 cultivares: Ccompis y Tacna.

Se cultivaron 20 ápices meristemáticos por Magenta conteniendo medio de cultivo específico por tratamiento. Luego se incubó por 3 semanas en un fotoperiodo de 16 horas luz a 1000 lux. El cual estuvo dividido en dos fases: 1 semana a  $18\pm 2$  °C y 2 semanas a 6 °C.

#### **3.2.3.1 Escisión de ápices meristemáticos:**

Se aisló los ápices meristemáticos (1.8-2.0 mm) y se colocaron sobre papel filtro en un medio MR. Se colocaron 10 ápices en el papel filtro (1.5 x 2.0 cm).

Se utilizó 40 ápices meristemáticos por cultivar (20 ápices congelados y 20 sin congelar) para cada uno de los tratamientos.

#### **3.2.3.2 Osmoprotección y vitrificación con PVS2**

Los ápices meristemáticos son colocados en crioviales conteniendo 2 ml de solución osmoprotectora (loading solution, LS) (Tabla N° 7), por 20 minutos. Se extrajo la solución LS y se colocó 2 ml de criopreservante PVS2 frío (Tabla N° 8). Luego se incubó a 0°C (sobre hielo) por 50 minutos.

#### **3.2.3.3 Congelamiento**

Diez ápices meristemáticos son transferidos a una pequeña gota de solución PVS2 sobre una tira de papel aluminio (0.5 x 2cm) y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. Los métodos son

llevados dentro de crioviales de tecnopor de 2 ml. de capacidad llenos de nitrógeno líquido.

#### **3.2.3.4 Descongelamiento y cultivo post-criopreservación**

Treinta minutos después del congelamiento, se extrajo del

#### **3.2.4. Aplicación de agentes antioxidantes: ácido ascórbico y glutatión reductasa, en el medio de post congelamiento**

nitrógeno líquido las tiras de papel aluminio que contienen los ápices meristemáticos. Inmediatamente, se llevó las tiras a un criovial conteniendo 4 ml de solución de recuperación (recovery solution, RS) (Tabla N° 9). Se agitó con el propósito de enjuagar las muestras y se dejará reposar por 20 minutos.

Se colocó los ápices en papel filtro sobre medio de cultivo MR de post congelamiento. Inicialmente el medio contuvo sucrosa 0.3M, a los 2 días, las muestras son transferidas al mismo medio conteniendo sacarosa 0.1M. Se incubó por 1 semana a 22°C y parcial oscuridad. Se transfirió los ápices a un medio MSA con 0.07M de sucrosa y sin papel filtro e incubó a  $18\pm 2$  °C y 16 horas luz de fotoperiodo.

Se aplicó diferentes dosis de antioxidantes (Tabla N° 12) en el medio MR con los diferentes miligramos de sucrosa explicado anteriormente. En el caso de Ácido Ascórbico se contó con cuatro tratamientos: T0 (control), T1 con 121uM (50 mg/L), T2 con 242uM (100 mg/L) y T3 con 363uM (150 mg/L) y Glutatión Reductasa con T0 (control), T1 de 12uM (5mg/L), T2 de 24uM (10 mg/L) y T3 de 36uM (15 mg/L).

Se evaluó el efecto de los antioxidantes de acuerdo al porcentaje de sobrevivencia y recuperación a los 30 después del descongelamiento.

### **3.2.5 Evaluación de sobrevivencia y recuperación.**

Se evaluó la sobrevivencia y recuperación de los ápices de acuerdo a los tratamientos utilizados. La sobrevivencia estuvo caracterizada por el color verde de los ápices meristemáticos, así como la formación de hojas y la recuperación por el número de plantas formadas a partir de los explantes criopreservados.

Se evaluó los explantes a los 30 días desde su introducción en el medio MR con 0.07M de sucrosa.

### **3.2.6 Análisis estadístico**

Los explantes fueron muestreados aleatoriamente y los resultados evaluados estadísticamente utilizando el Test de Proporciones RGui (Proyecto GNU, 2008), en el que se comparó las diferencias significativas de la reacción de los explantes a los tratamientos, así como la reacción de las variedades de papa utilizados en cada uno de los experimentos.

Considerándose lo siguiente:

- Número total de explantes
- Número de explantes que sobrevivieron
- Número de explantes que se recuperaron

La comparación se realizó entre los tratamientos utilizados en cada uno de los experimentos. Además, se comparó la reacción que tuvo cada una de las variedades utilizadas en cada uno de los tratamientos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Efecto del Sitosterol

#### 4.1.2. Efecto del Sitosterol Medio B

En las muestras no congeladas evaluadas a 30 días después de los tratamientos con crioprotectores, utilizando el Medio A, no se observaron diferencias significativas entre las dosis probadas y el control (Tabla N° 11, Gráfico N° 1 y 2, Figura N° 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Sin embargo, en términos de recuperación, la variedad Tacna (78%) mostró mayor tasa de recuperación que la variedad Ccompis (65%).

En las muestras congeladas, se observó una leve diferencia significativa ( $< 0.1$ ) en la recuperación; las dosis 0, 27 $\mu$ M y 54 $\mu$ M fueron significativamente semejantes y mayores que las dosis 108 $\mu$ M y 161 $\mu$ M; el mayor porcentaje (38%) se obtuvo con la dosis 27 $\mu$ M; no se observó diferencia significativa entre variedades (Tabla N° 11, Gráfico N° 1 y 2, Figura N° 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

#### 4.1.1. Efecto del Sitosterol Medio A

El comportamiento de los ápices no congelados en el Medio B mostraron diferencias significativas ( $< 0.001$ ) entre las dosis utilizadas y la muestra control (0  $\mu$ M) a los 30 días de evaluación (Tabla N°12), siendo esta última la que obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia (88%) y de recuperación (59%), es de destacar que con la dosis 54 $\mu$ M se obtuvo un resultado semejante a la del control, con 81% de sobrevivencia y 45% de recuperación. Las variedades utilizadas presentaron una respuesta genotipo dependiente, siendo Tacna la que tuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia (84%) y recuperación (51%).

Las muestras congeladas de ambas variedades presentaron una diferencia significativa ( $< 0.05$ ) de sobrevivencia, la muestra control tuvo

un mayor porcentaje (70%). Al igual que las muestras no congeladas, la dosis 54uM presentó una aproximación a la muestra control con 50% de sobrevivencia; la recuperación de los ápices no presentó diferencias significativas, donde la muestra control resultó con mayor viabilidad (24%). Ambos genotipos presentaron una leve diferencia significativa ( $< 0.1$  para la sobrevivencia y  $< 0.01$  para la recuperación), siendo Ccompis la de mayor viabilidad (56% de sobrevivencia y 23% de recuperación) (Tabla N° 12, Gráfico N° 3 y 4, Figura N° 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20).

La Tabla N° 13 muestra que la variedad Tacna presenta una mejor interacción con la dosis de 54uM en el post-congelamiento referente a la sobrevivencia (81%) y recuperación (61%)

## **4.2. Efecto de la Putrecina**

Los resultados obtenidos con yemas apicales cultivadas en medio enriquecido con putrecina no mostraron diferencias significativas entre el control y las dosis utilizadas con muestras no congeladas, sin embargo hay que destacar que la dosis de 250uM presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia (91%) y de recuperación (57%), mientras que los cultivares presentaron una mínima diferencia significativa en la sobrevivencia ( $< 0.1$ ), siendo Ccompis la que presentó un mejor resultado (sobrevivencia 96% y recuperación 64%). Los ápices congelados mostraron una respuesta similar a los no congelados, destacándose la dosis de 250uM con 72% de sobrevivencia, sin embargo el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo con el medio control (32%); ambas variedades presentaron diferencia significativa ( $< 0.001$ ) tanto en la sobrevivencia como en la recuperación, superado por Ccompis con 83% y 38% respectivamente. (Tabla N° 14, Gráfico N° 5 y 6, Figura N° 3, 21, 22, 23, 24, 25 y 26).

### **4.3. Efecto del Ácido Ascórbico**

EL efecto del ácido ascórbico en los ápices meristemáticos no congelados (Tabla N° 15, Gráfico N° 7 y 8, Figuras 3, 27, 28, 29, 30, 31 y 32), presentó una mínima diferencia significativa ( $< 0.05$ ) entre las dosis y el control, siendo este último el que obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia (76%) y recuperación (51%), seguido por la dosis de 50 mg/L, presentando 71% de sobrevivencia y 49% de recuperación, no habiendo diferencias significativas entre las dosis. Las variedades presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia de estos, siendo Tacna la mejor (74%) en comparación con Ccompis (49%). Las muestras congeladas también presentaron diferencias significativas en cuanto a las dosis aplicadas, tanto en su sobrevivencia ( $< 0.01$ ) y recuperación ( $< 0.05$ ), destacando con un mayor porcentaje de viabilidad la muestra control (65% en sobrevivencia y 29% en recuperación). No presentaron diferencia significativa entre las variedades utilizadas.

### **4.4 Efecto del Glutación Reductasa**

Los resultados de las pruebas utilizando un medio MS enriquecido con glutatión reductasa, muestra que los ápices meristemáticos no congelados evaluados a los 30 días (Tabla N° 16, Gráfico 9 y 10, Figuras 3, 33, 34, 35, 36, 37 y 38), no presentaron diferencias significativas entre las dosis probadas y la muestra control, sin embargo es de destacar que el mayor porcentaje de sobrevivencia (76%) y recuperación (52%) fue obtenida con la dosis de 15 mg/l. Se presentó diferencias significativas entre la sobrevivencia de las variedades ( $< 0.05$ ), donde un mayor porcentaje fue obtenido con la variedad Tacna (78%); a pesar de presentarse una diferencia significativa en la recuperación, al igual que en la sobrevivencia la variedad Tacna mostró un mayor porcentaje (44%). Los ápices congelados presentaron una respuesta similar a los ápices no congelados, siendo el control el que presentó un mejor porcentaje de sobrevivencia (65%) y recuperación (27%). La única diferencia significativa ( $< 0.05$ ) fue dada por la recuperación de las muestras de Ccompis, la que presentó un mayor porcentaje (31%) que las muestras de la variedad Tacna (18%). En la Tabla N° 17, se

destaca que la variedad Ccompis presenta una mejor interacción con la dosis de 15 mg/l (72% sobrevivencia y 41% recuperación), mientras que la variedad Tacna obtuvo mejor interacción con la dosis control (78 % sobrevivencia y 7% recuperación).

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Efecto del Sitosterol

Se conoce que los esteroides de las plantas no solo regulan los fluidos en la membrana y la permeabilidad sino también modulan la actividad de las enzimas en la unión en la membrana (Zhu, 2006). Sin embargo los estudios en cultivos de tejidos vegetales utilizando sitosterol son casi nulos, probablemente la falta de estos estudios se debe a la dificultad de la adicción de sitosterol a los medios respectivos. La literatura de Whitford y Manwaring (2004) y experiencias preliminares demostraron que la dilución de sitosterol para su adicción al medio de cultivo requiere del uso de solventes inorgánicos y detergentes. En el presente trabajo se estudio el efecto del sitosterol en la respuesta a criopreservación de dos genotipos de papa (Tacna y Ccompis) probando la adicción de este compuesto a través de dos métodos de dilución y adicción a los medios de cultivo.

Mediante el uso de sitosterol diluido en acetona y tween 20 (Medio A), no se observó ningún efecto relevante tanto en la sobrevivencia como en la recuperación de los ápices meristemáticos no congelados y congelados en la criopreservación. Este resultado es corroborado con lo reportado por Van de Houwe y col. (2004) donde se agregó 0.1 a 0.5 mM de colesterol, sitosterol o estigmasterol en un medio de pre-cultivo para criopreservación de banana utilizando el método de vitrificación, obteniendo ninguna diferencia por la adicción de esteroides mencionados. Las diferencias observadas entre genotipos trabajados, en las muestras no congeladas, sugiere que la respuesta es genotipo dependiente y que la variedad Tacna es más tolerante que la variedad Ccompis a los tratamientos estudiados.

Utilizando sitosterol diluido en 3 ml de acetona y 10.45 ml de etanol (90%) introducido en papel filtro al medio de cultivo (Medio B), no se obtuvo ningún efecto significativo, al igual que la respuesta obtenida con el Medio A, tanto para los ápices meristemáticos congelados y no congelados. Las respuestas de los

genotipos (Tacna y Ccompis) tuvieron una pequeña diferencia significativa, siendo Ccompis la variedad más tolerante a los efectos de la criopreservación. En general se pudo observar que las variedades en estudio respondieron mejor los primeros días después del congelamiento y a medida que pasa el tiempo va disminuyendo los porcentajes de sobrevivencia y recuperación de los ápices meristemáticos en el medio de cultivo.

Es importante destacar que en el presente estudio, en los controles no congelados, en ninguno de los tratamientos con sitosterol se observó efecto tóxico de este químico y de los crioprotectores, ya que las tasas de sobrevivencia fueron semejantes a las observadas en el tratamiento sin sitosterol.

## **5.2. Efecto de la Putrecina**

Nuestros resultados del ensayo demuestran que si bien no se obtuvo una diferencia significativa entre las dosis utilizadas y el control la utilización de 250uM de putrecina destacó en la sobrevivencia y recuperación de los ápices meristemáticos congelados y no congelados. Esta respuesta coincide con diferentes experimentos realizados donde se utilizó putrecina, entre ellos se encuentra el de Sakkanokho y col. (2005), quienes utilizaron dos dosis de putrecina (0.25 y 0.50 mg/L) en medios de cultivo para embriogénesis somática y regeneración de plantas de algodón, donde el mejor resultado se obtuvo utilizando 0.5 mg/L de putrecina. Al igual que en el libro de E.F.George de 1993 se puede encontrar múltiples experimentos donde se aplicó putrecina con buenos resultados, entre ellos se puede destacar la dosis de 50-100 uM de putrecina y 25 uM de ornitina, los cuales estimularon la división celular y formación de colonias de callos en protoplasmas de *Alnus*. En el artículo escrito por Mendoza y Rocha (2002) se describen diferentes experimentos realizados con poliaminas (Putrecina, espermidina y espermina), donde se observó que la utilización de estas ayuda a la estabilización, protección de la membrana contra daños por congelamiento, atenuación de la deshidratación y pérdida de la viabilidad, entre otros efectos observados en diferentes especies, como la papa pastusa (*Solanum tuberosum* L.) y la papa criolla (*Solanum phureja* Juz.et Buk). En el presente

experimento, se observó que la variedad Ccompis (*S. tuberosum subsp andigena var. chiar-imilla f. ccompis* Ochoa) fue la que obtuvo mejores resultados en la utilización de putrecina en su medio de cultivo.

### 5.3. Efecto del Ácido Ascórbico

La incorporación de ácido ascórbico (AA) en el medio de cultivo obtuvo un efecto negativo en la sobrevivencia y recuperación, donde los meristemos disminuían su viabilidad a medida que las dosis de AA incrementaban. La viabilidad obtenida por las muestras no congeladas tratadas con 50 y 100 mg/L de AA fue similar al control, mientras que la dosis más alta declinó la sobrevivencia y recuperación. Cuando las muestras fueron congeladas, todas las dosis de AA redujeron significativamente la viabilidad, indicando que estas concentraciones de ácido ascórbico son tóxicas para las plantas en estudio. La respuesta de los cultivares Ccompis y Tacna al ácido ascórbico fue similar. Al contrario de este resultado, se ha reportado que el uso de AA mostró efectos positivos en el cultivo de tejido de plantas específicas. Por ejemplo, AA exógeno incrementó azúcares libres solubles en callos viejos de *Nicotiana sp.* y mejoró la embriogénesis en tabaco y otros cultivos (George, 1993). Así también, AA aceleró el comienzo de la proliferación de células en raíces primordiales de *Allium*, *Pisum* y *Lupinus*, incrementando el número de células producidos durante la división celular en la fase G1, y estimuló a las células del centro quiescente en el ciclo celular en maíz y *Allium sp.* (Davey y col., 2000). Sin embargo, en el experimento conducido por Pinto y col. (2008), en donde se estudiaron los factores de influencia en la inducción de embriogénesis somática en *Eucalyptus globulus* Labill utilizando un medio basal y agentes anti-oxidantes con 100 mg/L de AA. Este no obtuvo resultados favorables, ya que no evitó la necrosis de los embriones estudiados, lo que indica así también que la utilización de antioxidantes en el medio de cultivo tiene un efecto negativo en esta especie, por lo que su uso no es recomendado.

## **5.4. Efecto del Glutación Reductasa**

Los experimentos realizados en la presente investigación con glutación reductasa se obtuvieron resultados positivos en las muestras no congeladas con la dosis de 15 mg/L. La recuperación de los cultivares tuvieron una respuesta genotípica en las muestras congeladas; la variedad Ccompis mostró una alta recuperación significativa (20%) que Tacna (13%). Estos resultados mostraron que el glutación reductasa tiene un efecto positivo en la recuperación de las variedades en estudio; un efecto similar fue encontrado en la criopreservación de citrus, en el cual el uso de 10 mg/L de glutación reductasa incrementó significativamente la sobrevivencia y recuperación de los meristemas (Wang y Deng, 2004). En cuanto a la actividad antioxidante, glutación reductasa tiene también un rol en la función metabólica básica en el desarrollo y morfogénesis de las plantas (Yeung y col, 2005), como la transición G1/S del ciclo celular durante el desarrollo post-embrionario de la raíz, acumulación de antocianinas, la programación de la muerte celular y resistencia a patógenos. La mayoría de las funciones son basadas en el análisis de plantas que contienen niveles bajos de glutación (Rouhier y col, 2008).

## VI. CONCLUSIONES

Las muestras no criopreservadas dieron mejores resultados que las sometidas a criopreservación (78.67% sobrevivencia y 52.99% recuperación vs. 58.11% sobrevivencia y 22.66% recuperación respectivamente), lo que muestra que las sustancias estudiadas reducen la viabilidad de los ápices de papa (Ccompis y Tacna).

- Las variedades utilizadas presentaron similar reacción a las sustancias utilizadas, la variedad Tacna obtuvo un 68.72% de sobrevivencia y 35.36% de recuperación, mientras que la variedad Ccompis se obtuvo 68.06% de sobrevivencia y 38.88% de recuperación.
- Las dosis utilizadas de sitosterol (27, 54, 108 y 161 uM) en el Medio A dio resultados similares a la muestra control (77.90% sobrevivencia y 35.67% recuperación), en especial con la dosis 27 uM (77.84% sobrevivencia y 38.04% recuperación), sin embargo a mayor dosis disminuye la viabilidad.
- Las dosis utilizadas (27, 54, 108 y 161 uM) en el Medio B enriquecido con sitosterol no presentó ninguna influencia en la viabilidad de las muestras estudiadas comparado con el control (70.21 % sobrevivencia y 23.57% recuperación).
- La concentración de 250 uM (40mg/L) de putrecina aumentó la sobrevivencia de las muestras congeladas (71.59%) como las no congeladas (91.29%).
- Las concentraciones utilizadas de ácido ascórbico en el medio de cultivo de meristemas de papa tuvieron una influencia negativa en la viabilidad de los mismos, disminuyendo de 45.83% a 28.69% en la sobrevivencia y de

20.65% a 10.83% en la recuperación; en comparación con el control, donde alcanzó 65.83% sobrevivencia y 30.45% recuperación.

- La aplicación de 15mg/L de glutatión reductasa al medio de cultivo tuvo una influencia positiva tanto en las muestras congeladas (60.14% sobrevivencia y 25.40% recuperación) como no congeladas (75.74% sobrevivencia y 51.88% recuperación), similar a las muestra control (64.57% sobrevivencia y 27.07% recuperación para las muestras congeladas y 68.32% sobrevivencia y 38.07% recuperación para las muestras no congeladas).

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar una metodología más simple para la incorporación de sitosterol al medio de cultivo, donde se pueda obtener el aprovechamiento completo del químico por la planta, además de disminuir los riesgos de contaminación u otros factores que puedan afectar la viabilidad de las muestras.
- Realizar un experimento específico con la dosis de 250uM de putrecina para corroborar los resultados obtenidos en la presente tesis y a su vez descartar efectos externos que puedan afectar la recuperación de las mismas.
- Se recomienda realizar experimentos con dosis más bajas (>50 mg/L) de ácido ascórbico para descartar su toxicidad.
- Es importante continuar con la experimentación con dosis mayores a 15 mg/L de glutatión, para determinar la concentración óptima que favorezca la criopreservación de meristemas de papa.
- Por último, se recomienda la utilización de otras variedades representativas de papa a fin de corroborar los resultados obtenidos en la presente tesis.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bhatt, P.N. y Bhatt, D.P. 1984. Changes in Sterol content during leaf aging and *in vitro* differentiation in *Solanum nigrum*. *Journal of Natural Products* Vol. 47, No. 3. **pp.** 426-432.
- Blagojevic, D. P. 2007. Antioxidant Systems in Supporting Enviromental and Programmed Adaptations to Low Temperatures. Institute for Biological Research, Department for Physiology. *CryiLetters* 28, 137-150, 2007, Serbia.
- Borda, C; Toledo, J; Golmirzaie, A y Roca, W. 2001. Efecto de inductores de tuberización y fotoperiodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. [www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01-100.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-100.pdf).
- Brown, C. 2005. Antioxidants in potato. *Amer Journal of Potato Res.* 82:163-172.
- Conabio. 2008. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM) Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. México. [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- Davey, M; Van Montagu, M; Inzé, D; Sanmartin, M; Kanellis, A; Smirnoff, N; Benzie, I; Strain, J; Favell, D y Fletcher, J .2000. Plant L-Ascorbic Acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825-860.
- Estrada, N. 1991. Importancia genética de las papas amargas. I Mesa Redonda: Perú – Bolivia. La Paz, Bolivia. 111 Págs.

- Gonzales-Arnan, M; Panta, A; Roca, W; Escobar, R y Engelman, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot tips and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell and Tissue and Organ Culture*. 92:1-13.
- George, E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part1. The Biotechnology*. Inglaterra. 476 págs.
- Hirai, D. y Sakai, A. 2000. Cryopreservation of vitro-grown meristem of potato (*Solanum tuberosum L.*) by encapsulation–vitrification. 2000 Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Editores Florent Engelman and Hiroko Takagi. Japón, pág. 205 – 216.
- Hirai, D. y Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batata (L) Lam*) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep.* 21:961-966.
- Kerksick, C. y Willoughby, D. 2005. Role of glutathione and n-acetyl cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J.of the Intl. Society of Sports Nutrition*. 2:38-44.
- McCarthy, F; Chopra, J; Ford, A; Hogan, S; Kerry, J; O’Brien, N; Ryan, E y Maguire, A. 2005. Synthesis, isolation and characterization of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol oxide derivatives. OBC: [www.rsc.org/obc](http://www.rsc.org/obc)
- Mendiburu, F. 2006. Estadística para aplicaciones en Investigación agrícola con R. Unidad de Informática para la Investigación (RIU). Centro Internacional de la Papa. Perú. 144 Págs.
- Mendoza, C y Rocha, P. J. 2002. Poliaminas: Reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas. *Palmas*. Vol. 23 N° 4.

- Ochoa, C. 1999. Las Papas de Sudamérica (Parte I). Centro Internacional de la Papa. Perú. 1036 Págs.
- Ochoa, C. 2001. Las papas de Sudamérica: Bolivia. Bolivia. 535 Págs.
- Panta, A; Panis, B; Ynouye, C; Criel, B; Swennen, R y Roca, W. 2006. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. *J. of Cryobiology*. 53:401.
- Panta, A; Panis, B; Sanchez, D; Canepa, P; Ynouye, C; Geuns, J, Swennen, R; Roca, W y Tay, D. 2009. Improved potato cryopreservation based on the identification of biochemical cell compounds linked to response to abiotic stress. 1st International Symposium Cryopreservation in horticultural species realizado en Bélgica.
- Pinto, G; Silva, S; Park, Y; Neves, L; Araújo, C y Santos, C. 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 95:79-88.
- Rouhier, N; Lemaire, S y Jacquot, J. 2008. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *The Annual Review of Plant Biology*. 59:143–66.
- Sakhanokho, H; Ozias-Akins, P; Lloyd, O y Chee, P. 2005. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 81:91-95.
- Shen, W., Nada, K y Tachibana, S. 2000. Involment of Polyamines in the Chilling Tolerance of Cucumber Cultivars. *Plant Physiology*. 124:431-439.

- Van de Houwe y COL. (2004). Safe Exchange of Musa germplasm knowledge of the genome and its application in Musa improvement. Presentación recopilada en el Advancing banana and plantain R&D in Asia and the Pacific – Vol.13. Procedente del 3er BAPNET Steering Committee meeting realizado en Guangzhou, China del 23-26 de Noviembre.
- Wang, Z y Deng, X. 2004. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. CryLetters 25:43-50.
- Whitford, W y Manwaring, J.2004. Lipids in Cell Culture Media. Application Specific Technical Information – Application Notes de Fisher Scientific. Pág. 152-154.
- Yeung, E; Belmonte, M; Tu, L y Stasolla, C. 2005. Glutathione Modulation of *in-vitro* Development. In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant. 41:584–590.
- Zhu, G; Geuns, J; Dussert, S; Swennen, R y Panis, B. 2006. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effect on cryopreservation. Physiologia Plantarum. 128:80-94.

## IX. ANEXOS

### 9.1 TABLAS

TABLA N° 1 MEDIO MURASHIGE & SKOOG (MS)

Compuestos	Concentración (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio	
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5	100 ml	
KNO <sub>3</sub>	19		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,4		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7		
<b>Micronutrientes</b>			
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,69	100 ml	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,89		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62		
KI	0,083		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	10 ml de solución 25mg/100ml		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 ml de solución 25mg/100ml		
<b>Fuente de Hierro</b>			
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00556		10 ml
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,00746		
<b>Vitaminas</b>			
Inositol	10	10 ml	
Nicotínico	0,05		
HCl-Piidoxina	0,05		
Glicina	0,2		
HCl-Tiamina	0,01		

TABLA N°2 MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE PLANTAS MADRE  
(MSAP)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Sacarosa	25 gr/L
Phytigel	3 gr/L
pH	5,6
*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)	

TABLA N° 3 MEDIO DE CULTIVO PARA PROPAGACIÓN (MSA)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Ácido giberélico	0.1 mg/L
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Sacarosa	25 gr/L
Agar	6 gr/L
pH	5,6
*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)	

TABLA N° 4 MEDIO DE PRE – CULTIVO (MSA – 25)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Sacarosa	25 gr/L
Phytigel	2.8 gr/L
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°5 MEDIO DE POST – CULTIVO I (MSA – 0.3)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Ácido giberélico	0.1 mg/L
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Kinetina	0.04 mg/L
Sacarosa	0.3 M (102 g)
Phytigel	2.8 gr/L
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°6 MEDIO DE POST – CULTIVO II (MSA – 0.1)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Ácido giberélico	0.1 mg/L
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Kinetina	0.04 mg/L
Sacarosa	0.1 M (34 g)
Phytigel	2.8 gr/L
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°7 CONCENTRACIÓN DE LOUDING SOLUTION (LS)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
Glicerol	2 M (73.7 ml)
Sacarosa	0.4 M (68.5 g)
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°8 CONCENTRACIÓN DE PVS2

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
Glicerol	3.26 M (120 ml)
Etilen glicol	2.42 M (67.4 ml)
Dimetil sulfóxido (DMSC)	1.9 M (68.2 ml)
Sacarosa	0.4 M (68.5 g)
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°9 CONCENTRACIÓN DE RECOVERY SOLUTION (RS)

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
Sales MS*	4.3 g
<b>Stocks:</b>	
Gicina.HCl	2 mg/L
myo-inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L
Tiamina-HCl	0.1 mg/L
Sacarosa	1.2 M (205.3 g)
pH	5,8

\*Sales basales de Murashige & Skoog (1986)

TABLA N°10 CONCENTRACIÓN DE QUÍMICOS

CONCENTRACIÓN DE QUÍMICOS UTILIZADOS	DOSIS $\mu$ M	DOSIS mg/l
Sitosterol	27 - 161	11.15 – 66.9
Putrecina	125 - 375	20 – 40
Ácido Ascórbico		50 – 150
Glutación Reductasa		5 – 15

TABLA N° 11 RESULTADOS DE SITOSTEROL EN MEDIO A  
RESPUESTA DE LAS VARIEDADES CCOMPIS Y TACNA EN MEDIO A ENRIQUECIDO CON SITOSTEROL

Efecto Sitosterol diluido Dosis ( $\mu$ M)	No Congelado				Congelado			
	Medias $\pm$ ES <sup>1</sup>				Medias $\pm$ ES <sup>1</sup>			
	Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)		Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)	
0	96.42 $\pm$ 1.51	a	82.47 $\pm$ 4.47	a	77.90 $\pm$ 4.40	a	35.67 $\pm$ 6.32	a
27	91.40 $\pm$ 2.05	a	73.08 $\pm$ 4.44	a	77.84 $\pm$ 6.03	a	38.04 $\pm$ 7.91	a
54	91.29 $\pm$ 3.35	a	70.00 $\pm$ 7.74	a	74.19 $\pm$ 6.94	a	36.41 $\pm$ 8.47	a
108	88.24 $\pm$ 5.18	a	67.52 $\pm$ 9.37	a	67.14 $\pm$ 7.33	a	17.34 $\pm$ 6.28	ab
161	89.37 $\pm$ 3.53	a	62.49 $\pm$ 7.14	a	65.03 $\pm$ 7.12	a	23.58 $\pm$ 6.30	b
C.V	11.55		30.07		27.88		71.84	
Pr>F <sup>2</sup>	n.s		n.s		n.s		n.s	
Efecto Cultivar								
Ccompis	89.35 $\pm$ 2.62	a	64.51 $\pm$ 4.42	b	76.45 $\pm$ 4.32	a	35.50 $\pm$ 5.65	a
Tacna	93.33 $\pm$ 1.41	a	77.72 $\pm$ 4.04	a	68.40 $\pm$ 3.69	a	24.92 $\pm$ 3.06	a
Pr>F <sup>2</sup>	n.s		<0.01		n.s		<0.1	

<sup>1</sup>ES (error estándar)

<sup>2</sup> Datos analizados por LSD

<sup>3</sup> Datos no mostraron homogeneidad de varianza

<sup>4</sup> Datos no mostraron normalidad

**TABLA N° 12 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO B  
RESPUESTA DE LAS VARIEDADES CCOMPIS Y TACNA EN MEDIO B ENRIQUECIDO CON SITOSTEROL**

Efecto Sitosterol papelito Dosis (uM)	No Congelado				Congelado			
	Medias±ES <sup>1</sup>				Medias±ES <sup>1</sup>			
	Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)		Sobrevivencia (%)		Recuperación (%) <sup>5</sup>	
0	88.44±3.55	a	58.67±6.02	a	70.21±6.90	a	23.57±6.04	a
27	78.78±4.16	bc	39.28±5.74	b	44.88±6.68	b	15.84±6.04	a
54	80.60±5.12	ab	45.05±6.03	ab	50.21±7.58	ab	11.25± 4.02	a
108	63.77±6.75	d	33.10±8.12	b	45.50±9.29	b	14.94± 7.11	a
161	68.46±5.06	cd	35.47±5.77	b	38.70±6.70	b	12.92±5.03	a
C.V	17.02		40.42		46.68		107.75	
Pr>F <sup>2</sup>	<0.001		<0.05		<0.05		n.s	
Efecto Cultivar								
Ccompis	68.52±3.95	b	34.17±4.66	b	55.77±5.31	a	23.30±4.31	a
Tacna	83.50±2.31	a	50.46±3.23	a	44.03±4.56	a	8.11±1.68	b
Pr>F <sup>2</sup>	<0.001		<0.01		<0.1		<0.01	

<sup>1</sup>ES (error estándar)

<sup>2</sup>Datos analizados por LSD

<sup>3</sup>Datos no mostraron homogeneidad de varianza

<sup>4</sup>Datos no mostraron normalidad

TABLA N° 13 RESULTADO DE LA INTERACCIÓN DE SITOSTEROL EN MEDIO B CON LAS VARIEDADES DE PAPA

**INTERACCIÓN LAS VARIEDADES DE PAPA CON SITOSTEROL EN MEDIO B**

Cultivar/Dosis (mg/l)	Medias±ES <sup>1</sup>			
	Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)	
Ccompis : 0	88.00±5.61	a	60.95±11.19	a
Ccompis : 11.15	76.57±8.19	ab	36.58±11.08	bc
Ccompis : 22.3	68.10±6.19	b	29.57±5.25	cd
Ccompis : 44.6	46.85±6.08	c	13.21±6.50	d
Ccompis : 66.9	63.11±7.58	bc	30.53±5.75	c
Tacna : 0	88.88±5.02	a	56.41±5.94	ab
Tacna : 11.15	81.00±2.92	ab	42.00± 4.64	abc
Tacna : 22.3	93.10±1.17	a	60.52±4.04	a
Tacna : 44.6	80.69±5.02	ab	52.98±7.52	abc
Tacna : 66.9	73.82±6.58	b	40.41±10.23	abc

**TABLA N° 14 RESULTADO DE PUTRECINA EN MEDIO MS  
RESPUESTA DE LAS VARIETADES COMPIS Y TACNA EN MEDIO MS ENRIQUECIDO CON PUTRECINA**

Efecto de la Putrescina Dosis (uM)	No Congelado				Congelado			
	Medias±SE <sup>1</sup>				Medias±SE <sup>1</sup>			
	Sobrevivencia (%) <sup>4</sup>		Recuperación (%)		Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)	
0	90,82±5.85	a	63.79±9.17	a	65,46±11,69	a	31.92±9.30	a
125	90,83±5,25	a	56.81±9.71	a	70,86±7,33	a	19.81±6.52	a
250	91,29±4,57	a	57.47±10.45	a	71,59±8,11	a	27.14±9.08	a
375	88,96±6,85	a	48.93±12.52	a	63,18±10,27	a	23.07± 6.55	a
CV	17.13		54.31		31.99		69.76	
Pr>F	n.s		n.s		n.s		n.s	
<b>Efecto del cultivar</b> <sup>3</sup>								
Ccompis	95.82±2,57	a	63.60±5.14	a	82,89±3,23	a	38.29±5.62	a
Tacna	85.13±4,47	b	49.90±8.64	a	52,66±6,72	b	12.69± 2.95	b
Pr>F	<0.1		n.s		<0.001		<0.001	

<sup>1</sup>ES (Error Estandar)

<sup>2</sup>Datos analizados por LSD

<sup>3</sup>Resultados no mostraron homogeneidad de varianza

<sup>4</sup>Datos no mostraron normalidad

TABLA N° 15 RESULTADOS DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN MEDIO MS

RESPUESTA DE LAS VARIETADES CCOMPIS Y TACNA EN MEDIO MS ENRIQUECIDO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

Efecto del Ác. Ascórbico Dosis (mg/l) <sup>3</sup>	No Congelado				Congelado			
	Medias±SE <sup>1</sup>				Medias±SE <sup>1</sup>			
	Supervivencia (%)		Recuperación (%)		Supervivencia (%)		Recuperación (%)	
0	75.83±6.76	a	50.00±6.83	a	65.83±5.11	a	30.45±7.31	a
50	71.23±7.42	a	51.01±9.41	a	45.83±7.35	ab	20.65±5.41	ab
100	61.58±11.04	ab	46.14±8.13	a	24.44±7.35	b	8.14±2.96	b
150	47.50±9.64	b	31.68±4.60	a	28.60±9.38	b	10.83±4.17	b
C.V	23.25		41.40		41.45		78.63	
Pr>F	<0.05		n.s		<0.01		<0.05	
Efecto del cultivar <sup>3</sup>								
Ccompis	48.53±5.68	b	38.00±5.14	a	35.11±7.97	a	18.75±5.23	a
Tacna	79.54±4.14	a	51.40±5.19	a	47.24±5.36	a	16.28± 3.34	a
Pr>F	<0.001		<0.1		n.s		n.s	

<sup>1</sup>ES (Error Estandar)

<sup>2</sup> Datos analizados por Kruskal Wallis

<sup>3</sup> Datos analizados por LSD

<sup>4</sup> Resultados no mostraron homogeneidad de varianza

TABLA N° 16 RESULTADO DE GLUTATIÓN REDUCTASA EN MEDIO MS

RESPUESTA DE LAS VARIEDADES CCOMPIS Y TACNA EN MEDIO MS ENRIQUECIDO CON GLUTATIÓN

Efecto del Glutatión Dosis (mg/l)	No Congelado				Congelado			
	Medias±SE <sup>1</sup>				Medias±SE <sup>1</sup>			
	Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)		Sobrevivencia (%)		Recuperación (%)	
0	68.32± 6.53	a	38.07±5.57	a	64.57± 7.56	a	27.07±8.80	a
5	75.31±7.51	a	44.45± 7.92	a	57.34±8.57	a	25.20±5.98	a
10	66.59±5.61	a	37.54±4.75	a	55.04±6.76	a	19.85±4.67	a
15	75.74± 5.09	a	51.88±6.59	a	60.14± 5.84	a	25.40± 7.13	a
C.V	22.54		42.59		30.76		67.11	
Pr>F <sup>2</sup>	n.s		n.s		n.s		n.s	
Efecto del cultivar								
Ccompis	65.47±4.29	b	42.16±4.98	a	62.69±3.71	a	30.46±3.69	a
Tacna	77.51±3.94	a	43.81±4.10	a	55.86±5.95	a	18.30±5.08	b
Pr>F <sup>2</sup>	<0.05		n.s		n.s		<0.05	

<sup>1</sup>ES (error estándar)

<sup>2</sup>Datos analizados por LSD

<sup>3</sup>Datos no mostraron homogeneidad de varianza

<sup>4</sup>Datos no mostraron normalidad

TABLA N° 17 RESULTADO DE LA INTERACCIÓN DE GLUTATIÓN  
 REDUCTASA CON LAS VARIEDADES DE PAPA  
**INTERACCIÓN DE LAS VARIEDADES DE PAPA CON GLUTATIÓN**

<b>Cultivar/Dosis (mg/l)</b>	<b>Medias±ES<sup>1</sup></b>			
	<b>Sobrevivencia (%)</b>		<b>Recuperación (%)</b>	
Ccompis : 0	51.25±5.15	bc	17.50± 6.61	ab
Ccompis : 5	60.31±10.81	abc	34.06±8.53	a
Ccompis : 10	66.92±4.51	abc	29.70±2.81	ab
Ccompis : 15	72.29±5.42	ab	40.58±7.34	a
Tacna : 0	77.90±11.05	a	7.35±16.02	a
Tacna : 5	54.37±14.83	bc	16.34± 6.47	ab
Tacna : 10	43.16± 9.94	c	10.00± 5.40	b
Tacna : 15	48.00±5.58	bc	10.22±5.43	b

## 9.2 GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO A

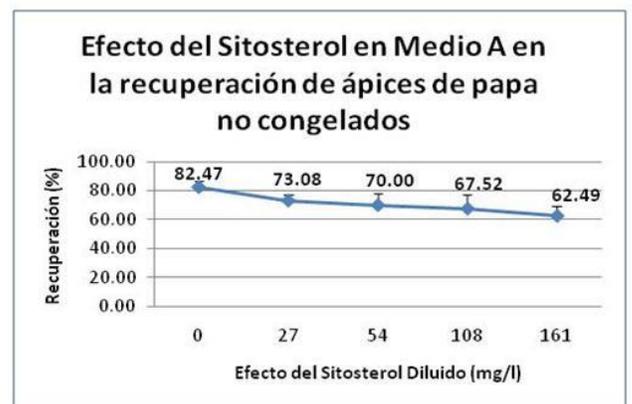
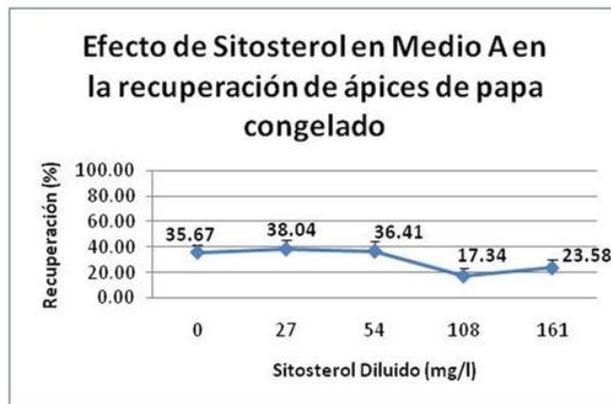
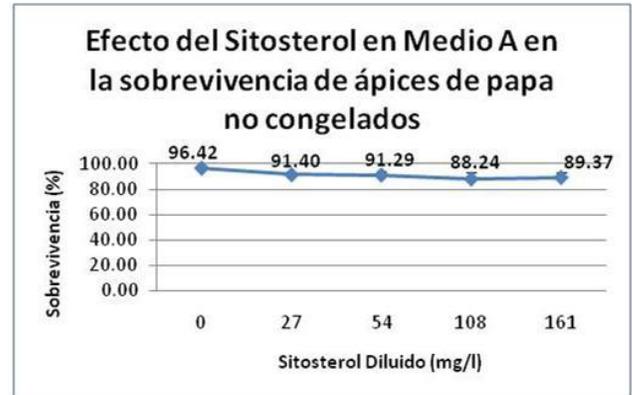
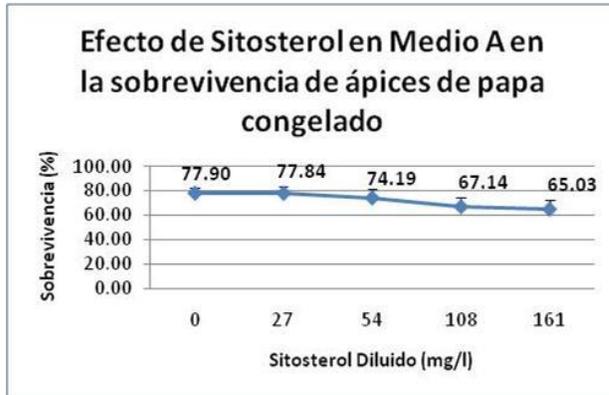


GRÁFICO N° 2 EFECTO DEL SITOSTEROL EN MEDIO A EN LAS VARIEDADES DE PAPA

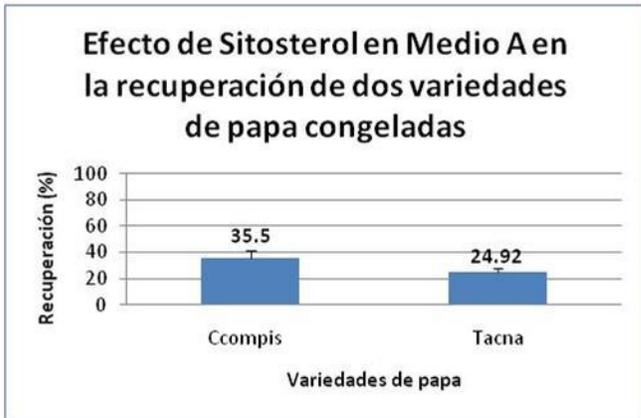
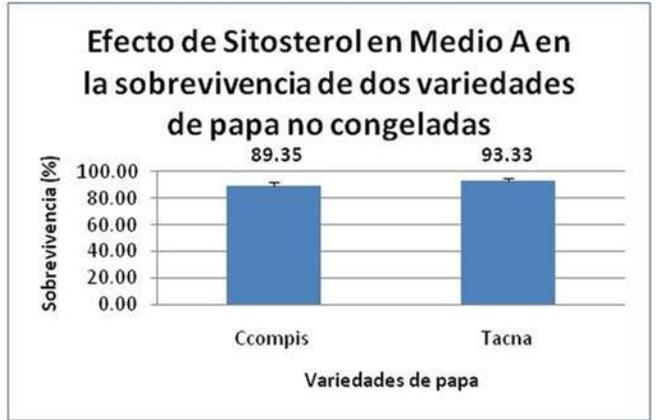


GRÁFICO N° 3 RESULTADO DE SITOSTEROL EN MEDIO B

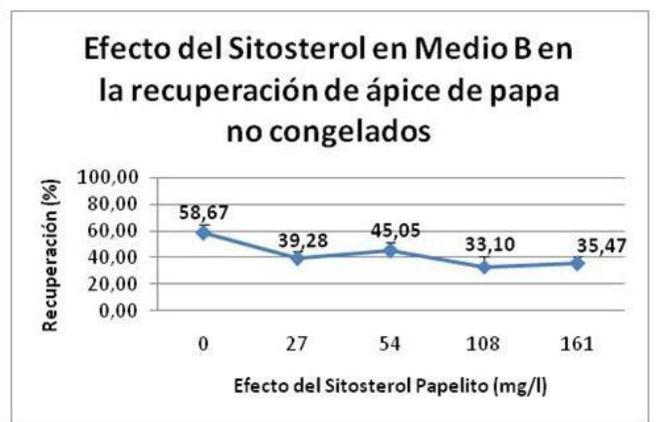
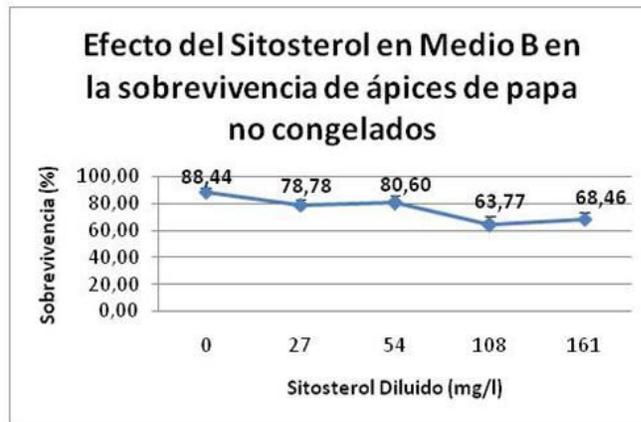
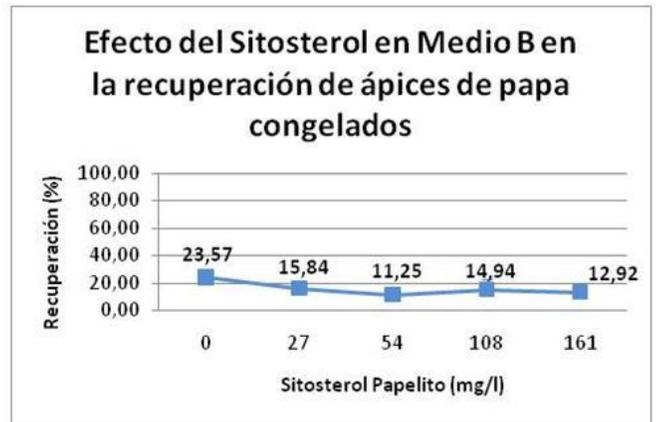
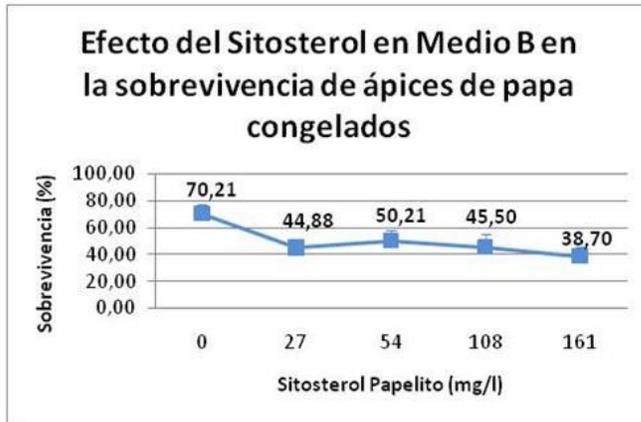


GRÁFICO N° 4 EFECTO DEL SITOSTEROL EN MEDIO B EN LAS VARIEDADES DE PAPA

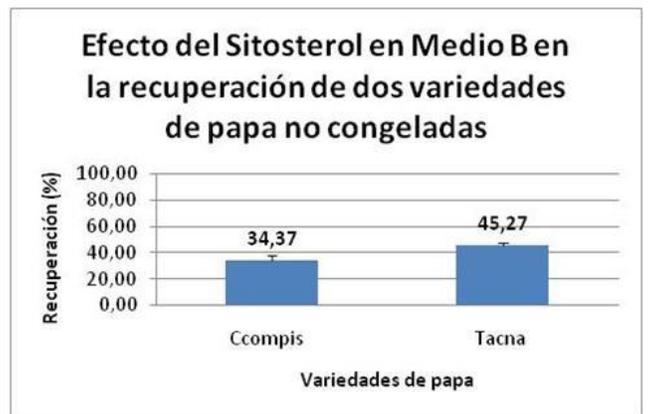
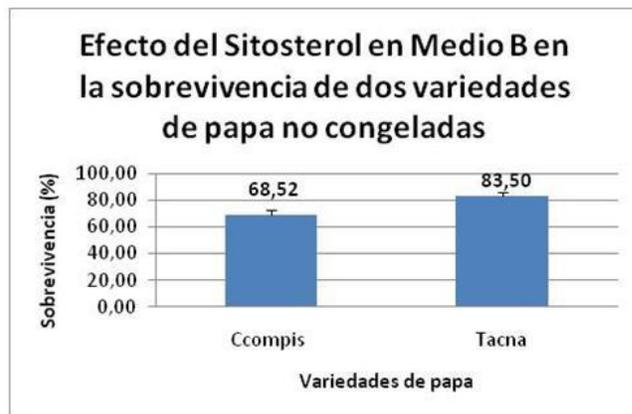


GRÁFICO N° 5 RESULTADO DE PUTRESCINA

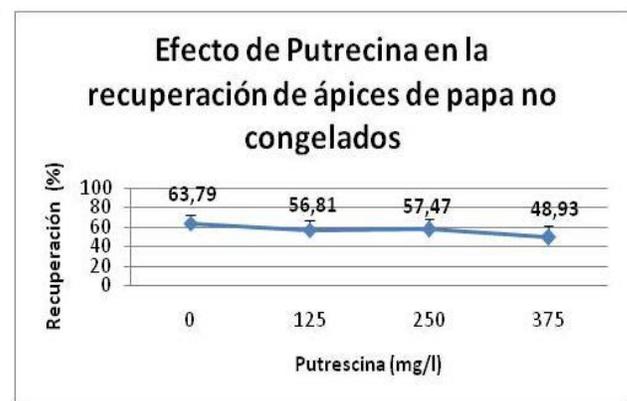
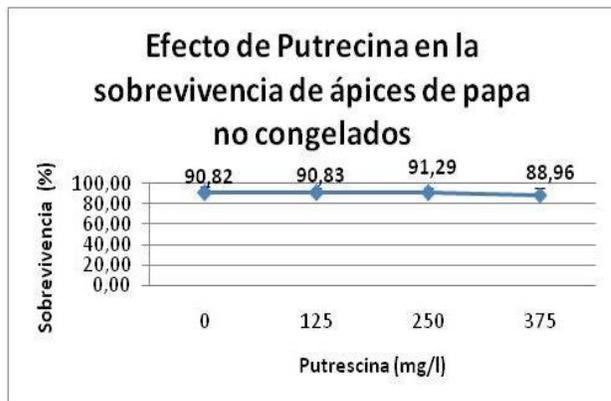
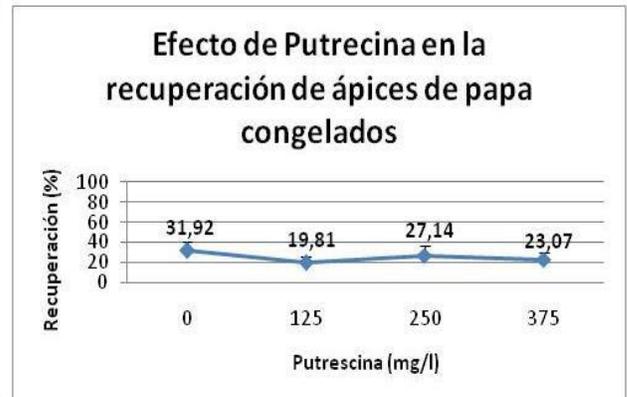
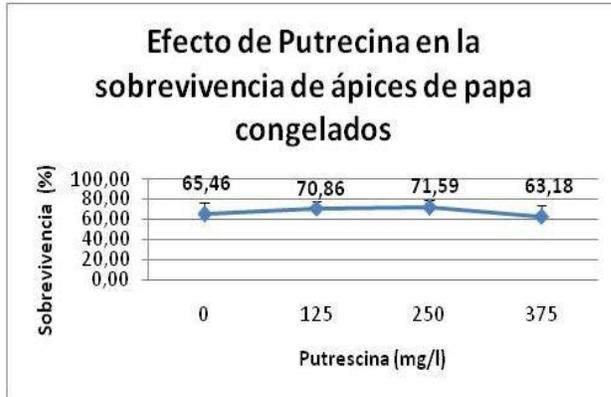


GRÁFICO N° 6 EFECTO DE PUTRESCINA EN LAS VARIEDADES DE PAPA

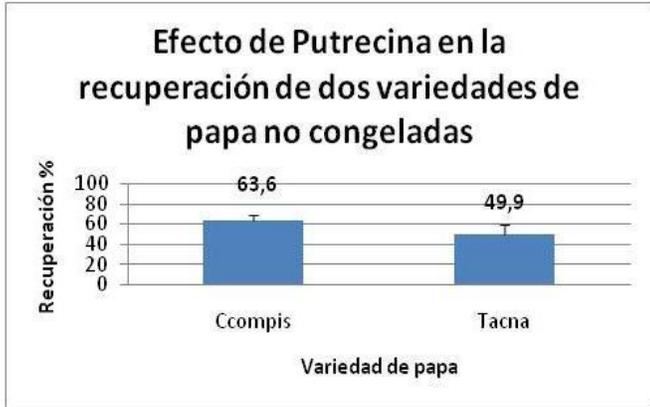


GRÁFICO N° 7 RESULTADO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

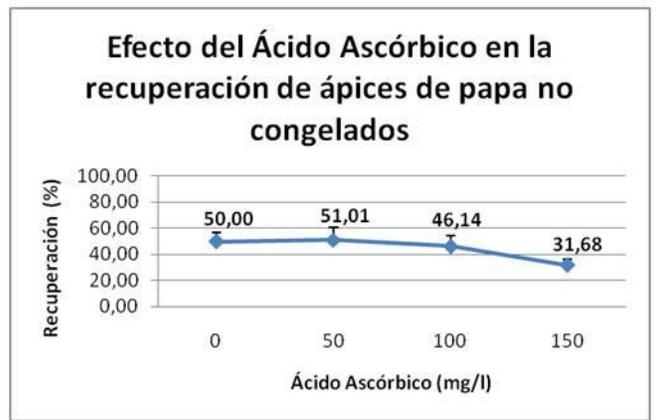
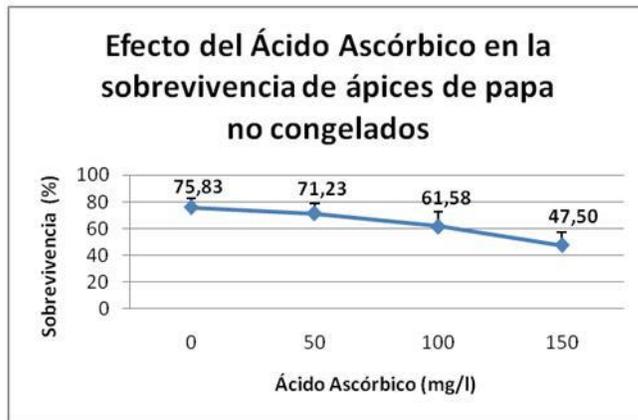
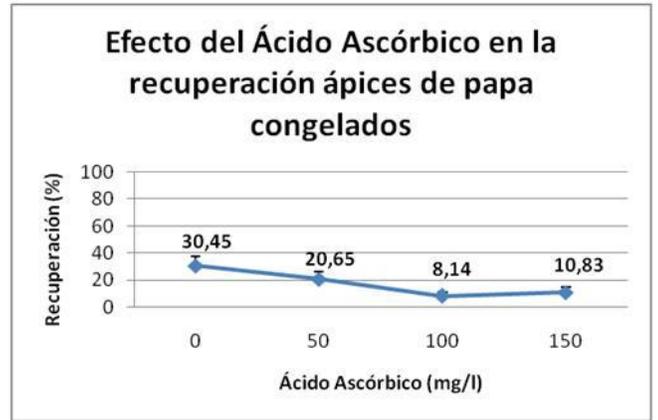
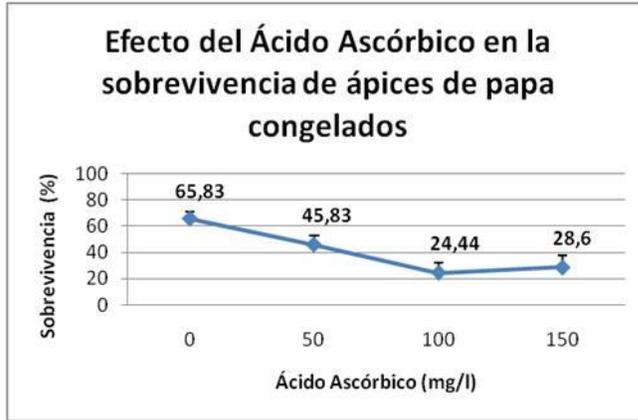
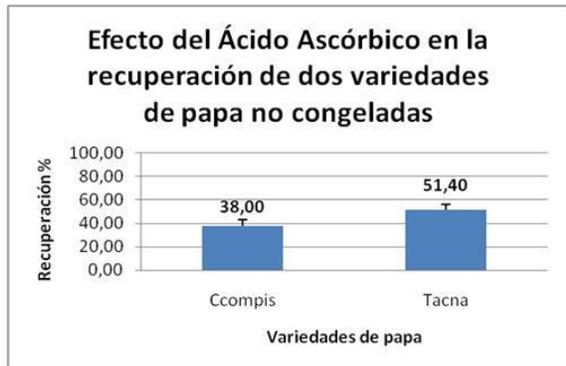
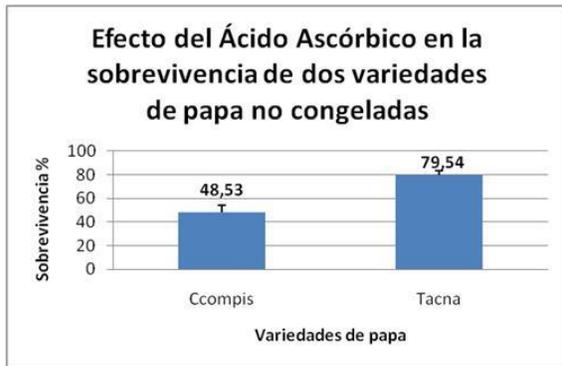
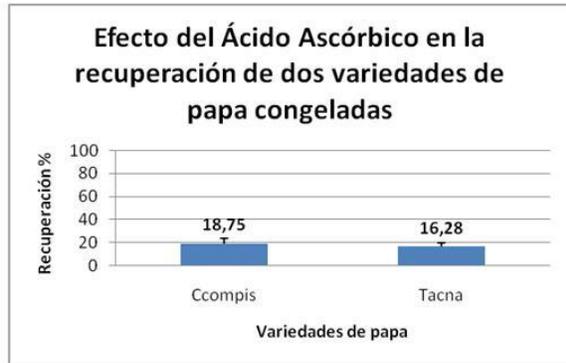
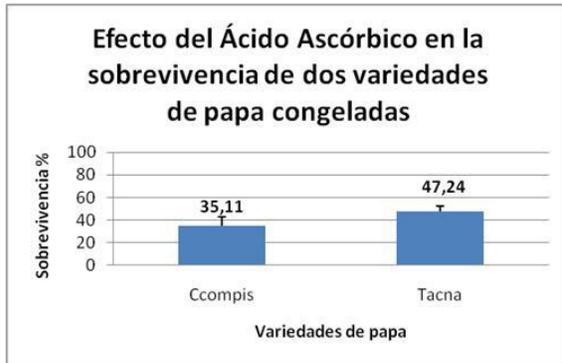


GRÁFICO N° 8 EFECTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LAS VARIEDADES DE PAPA



## GRÁFICO N° 9 RESULTADO DE GLUTATIÓN REDUCTASA

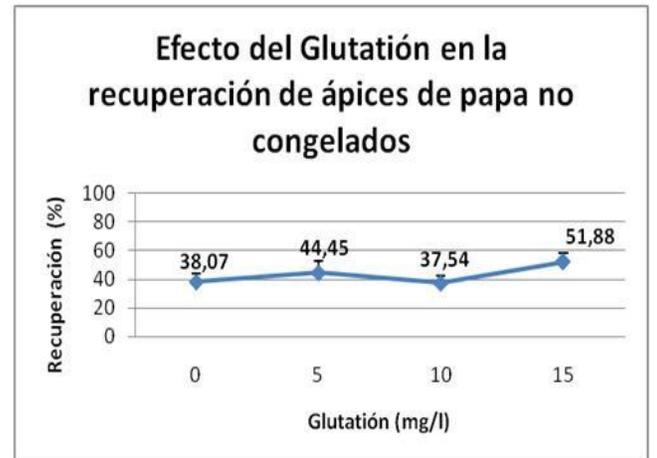
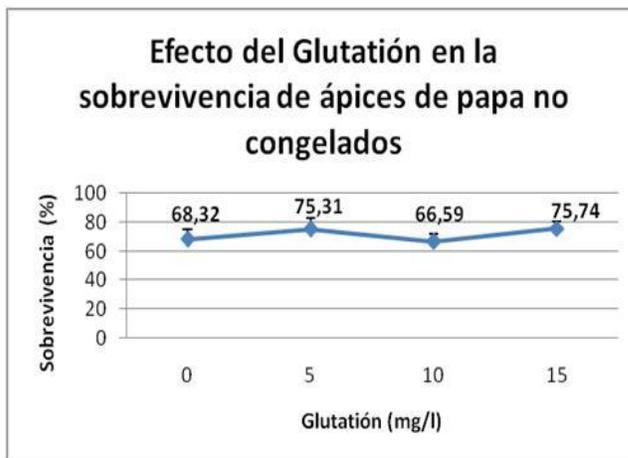
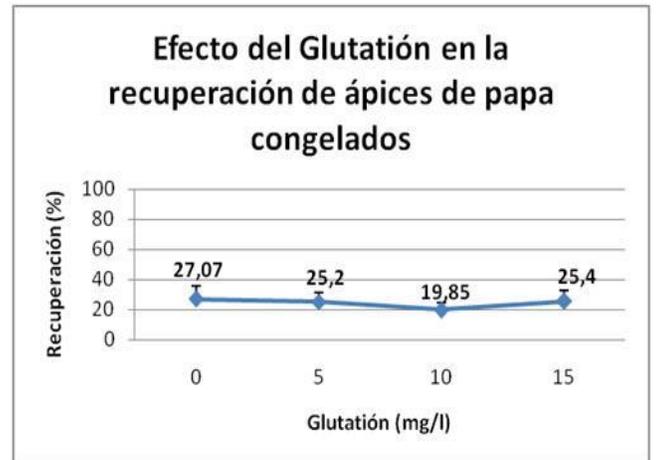
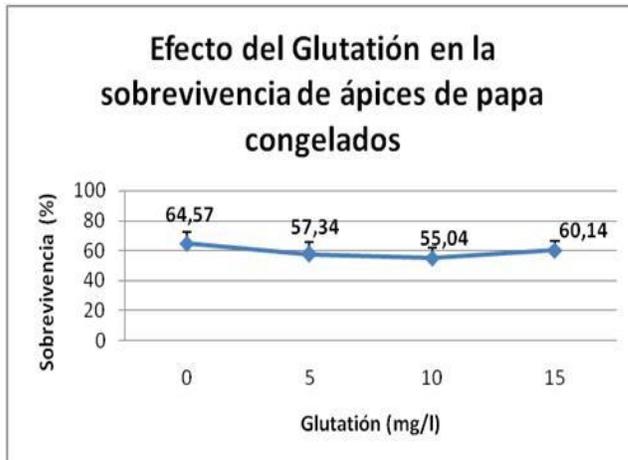
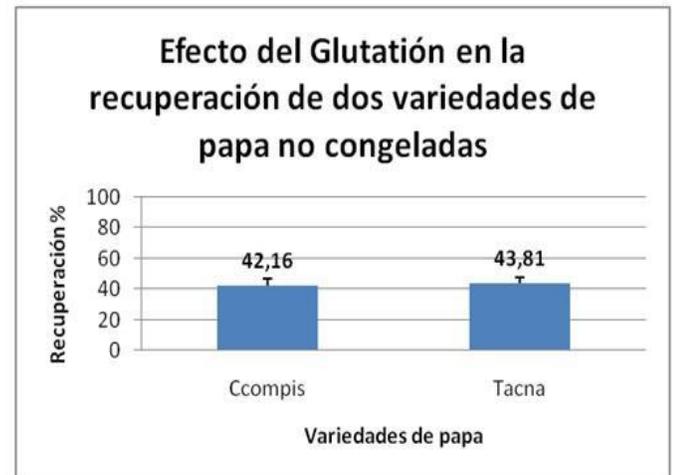
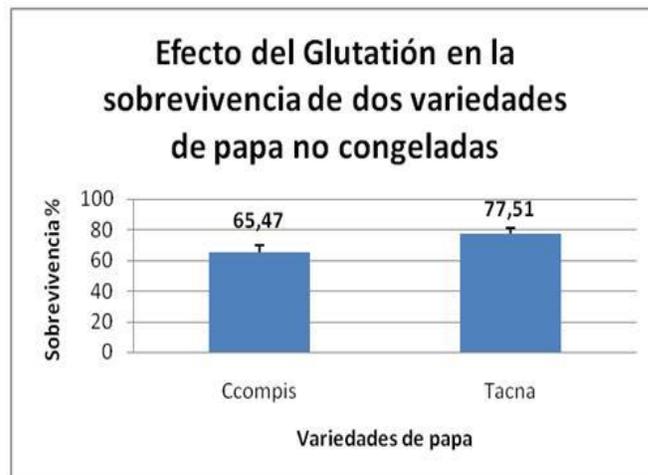
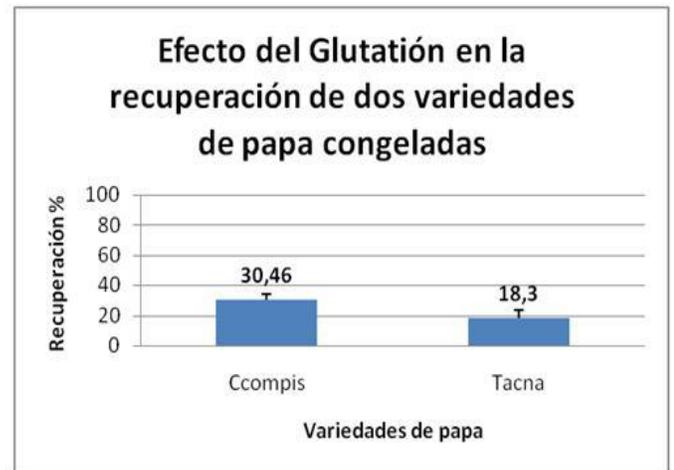
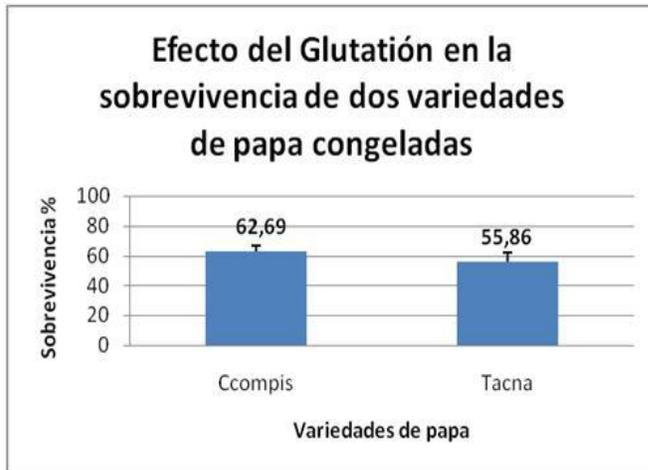
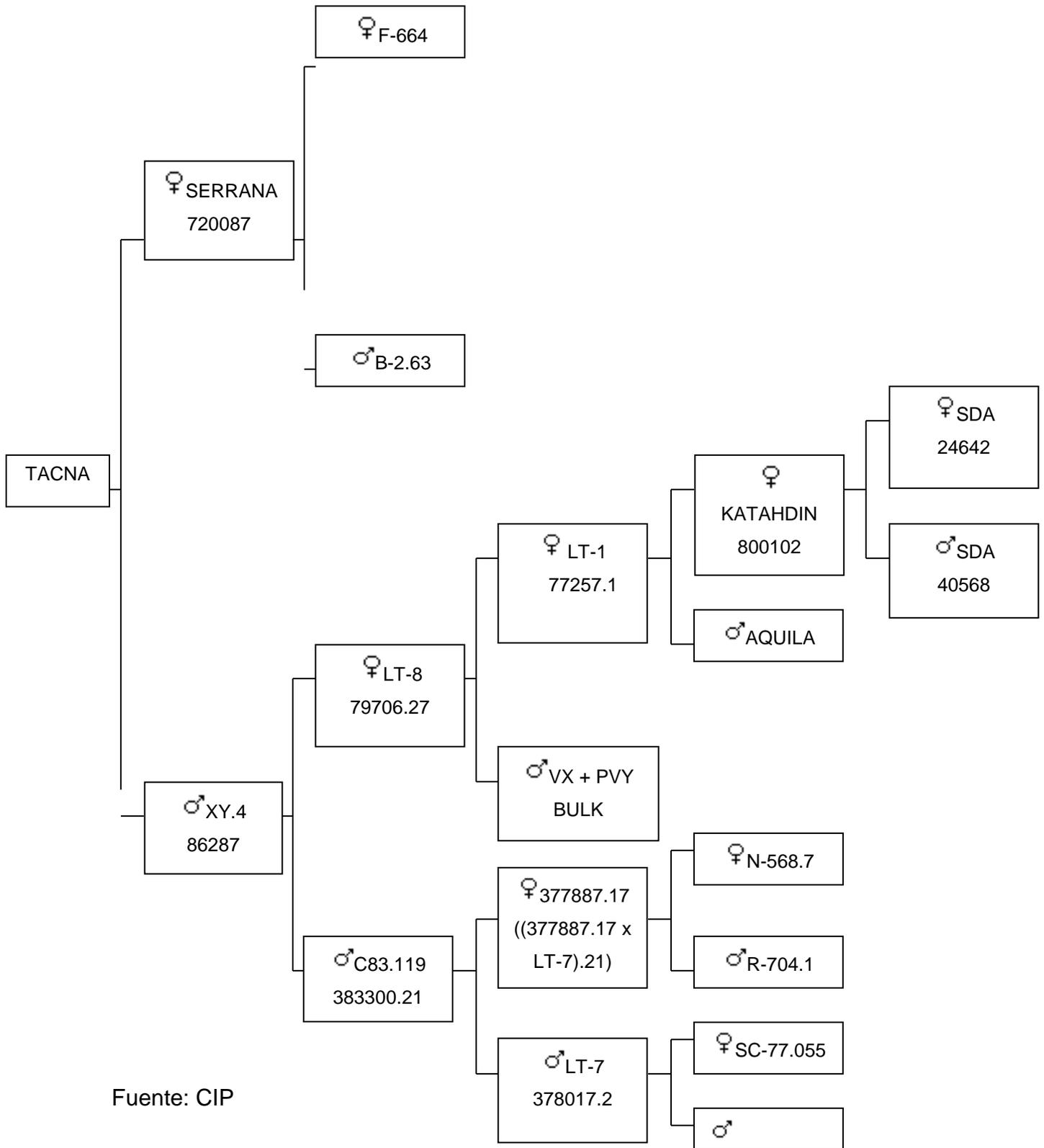


GRÁFICO N° 10 EFECTO DE GLUTATIÓN REDUCTASA EN LAS VARIEDADES DE PAPA



### 9.3 FIGURAS

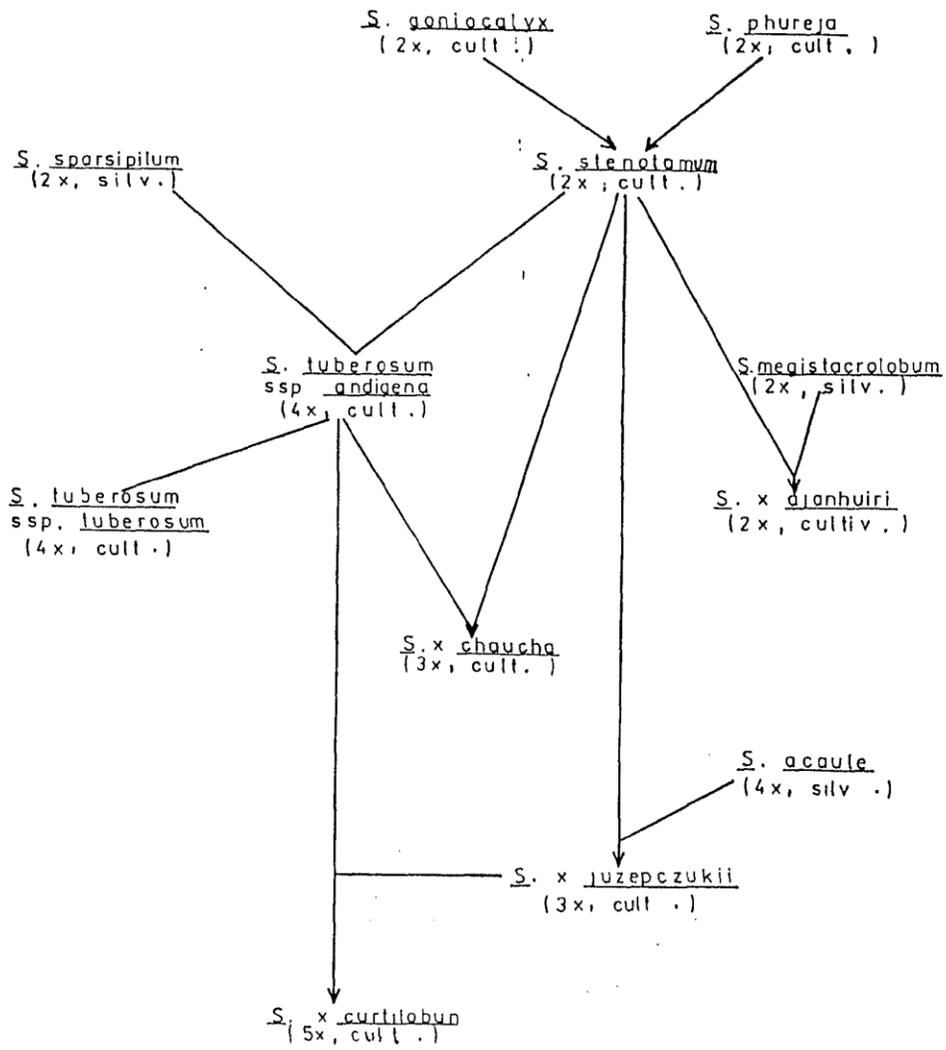
FIGURA N° 1 Pedigrí Variedad Tacna



Fuente: CIP

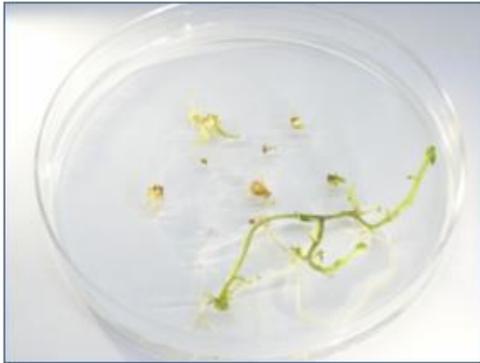
FIGURA N° 2 Pedigrí Variedad Ccompis

Figura 1 : Relacion de parentesco evolutivo de las papas cultivadas (Hawkes, 1979)

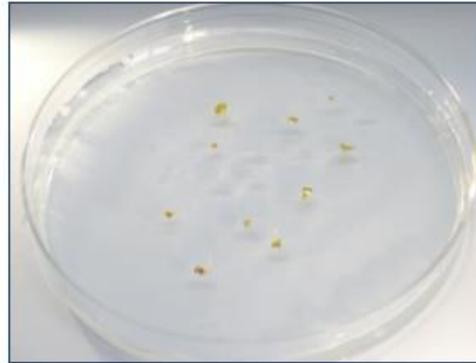


Fuente: Estrada, 1991.

FIGURA N° 3 MUESTRAS CONTROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE LA  
VARIEDAD CCOMPIS



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 4 MUESTRA CONTROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE LA  
VARIEDAD TACNA



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 5 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 27  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A

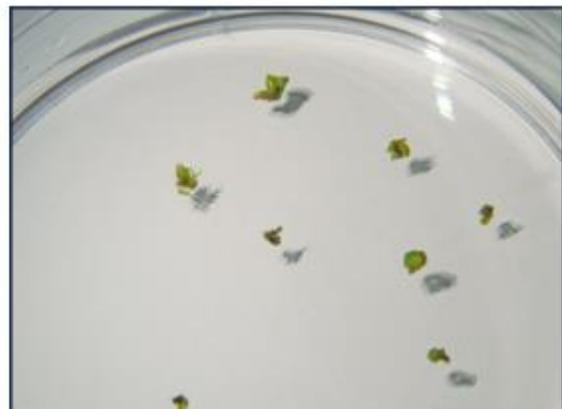


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 6 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 54  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

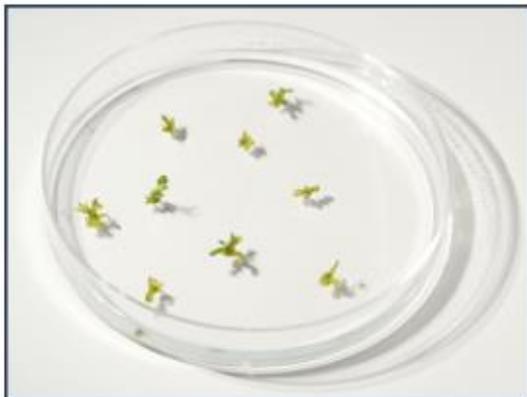
FIGURA N° 7 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 108  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

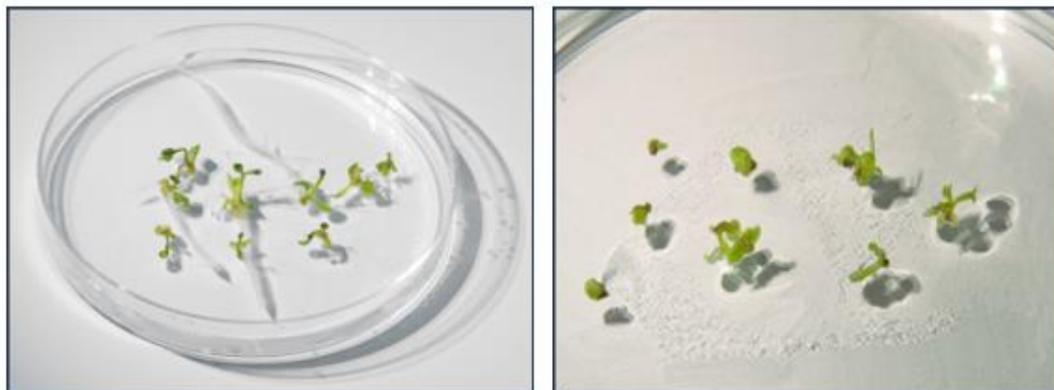
FIGURA N° 8 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 161  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

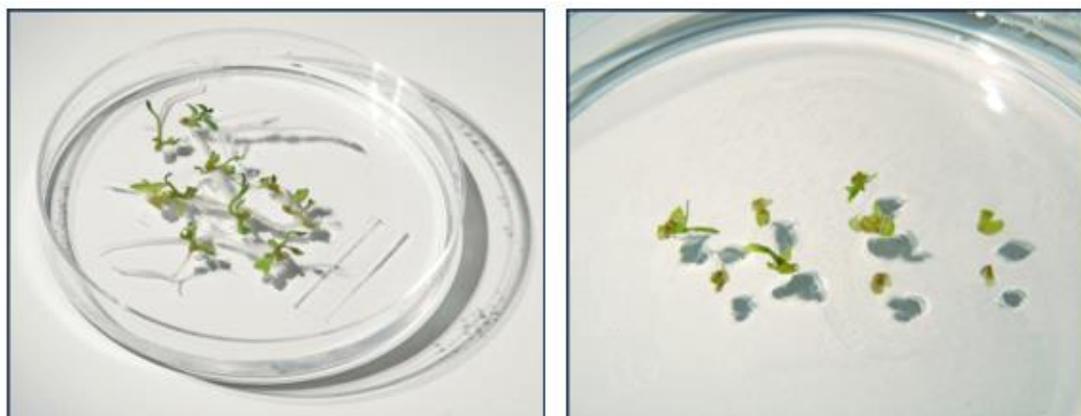
FIGURA N° 9 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
27  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 10 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
54  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

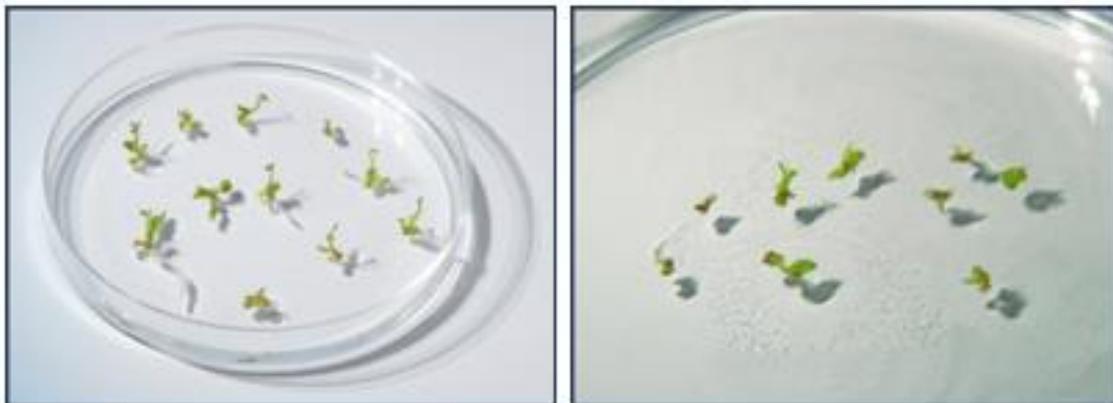
FIGURA N° 11 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
108  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

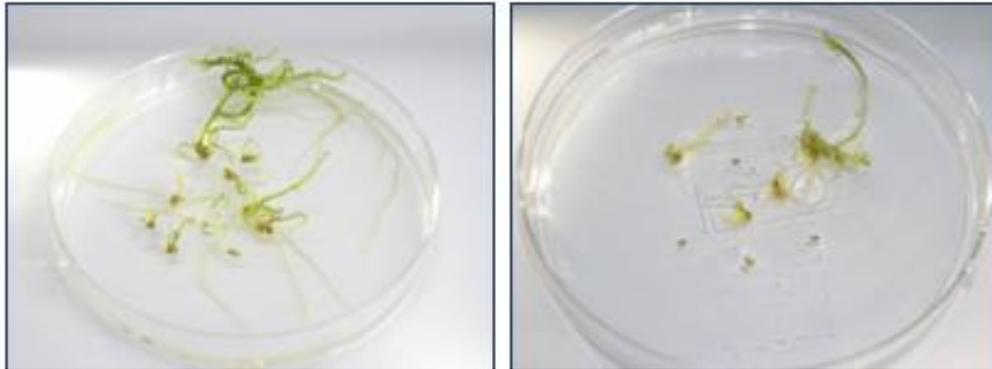
FIGURA N° 12 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
161  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO A



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

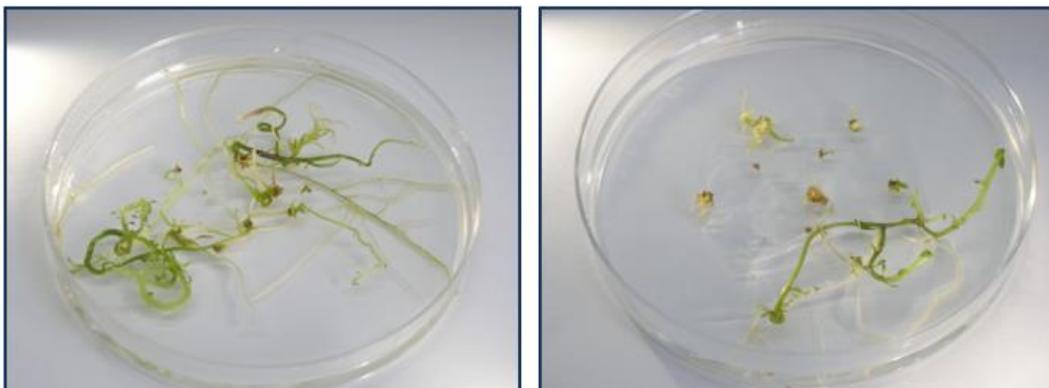
FIGURA N° 13 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 27  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 14 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 54  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 15 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 108  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 16 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 161  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 17 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
27  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 18 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
54  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 19 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
108  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 20 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
161  $\mu$ M DE SITOSTEROL EN MEDIO B

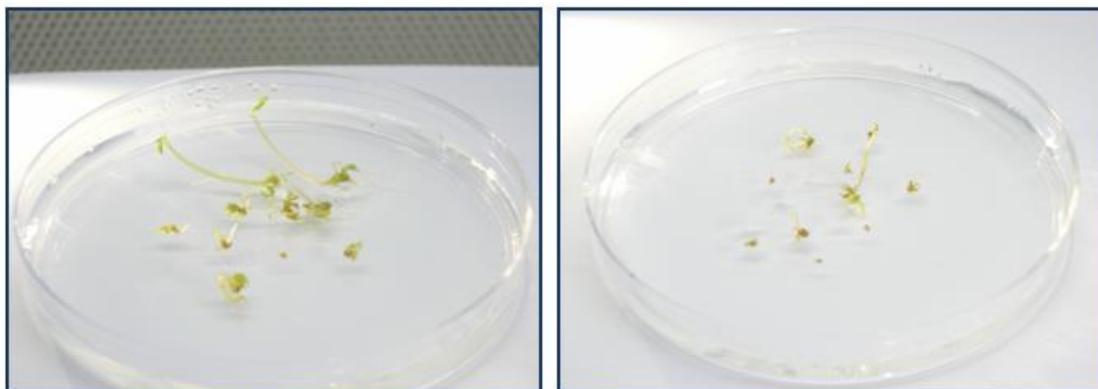


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

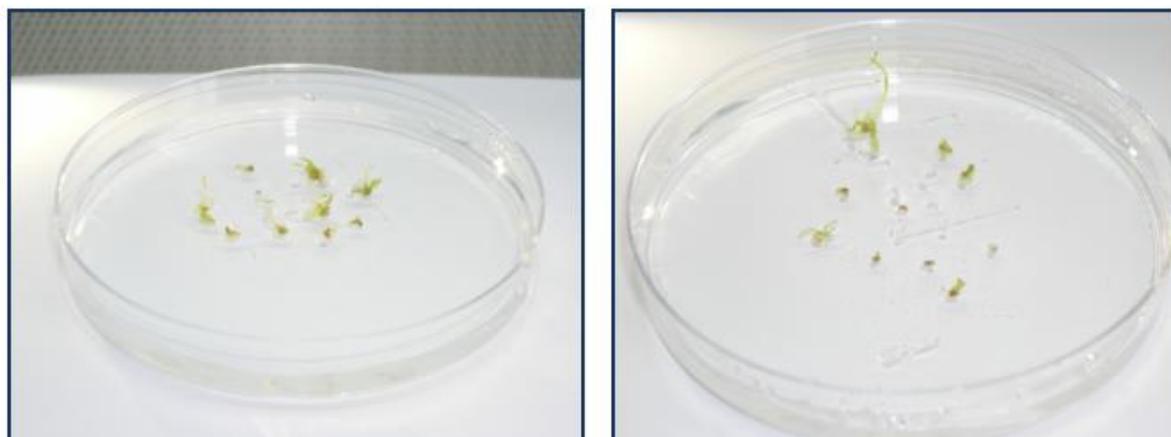
FIGURA N° 21 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 125  $\mu$ M DE PUTRESCINA



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 22 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 250  $\mu$ M DE PUTRESCINA



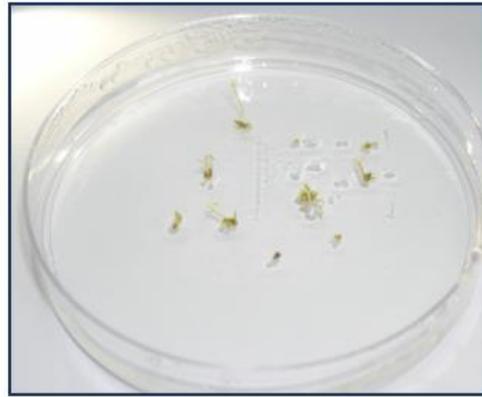
**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 23 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 375  $\mu$ M DE PUTRESCINA

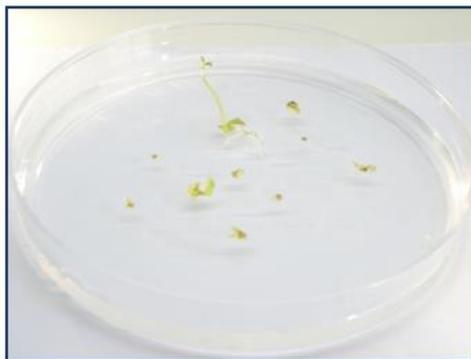


**Muestra No Congelada**

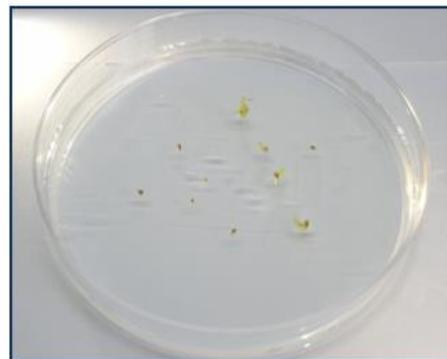


**Muestra Congelada**

FIGURA N° 24 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
125  $\mu$ M DE PUTRESCINA

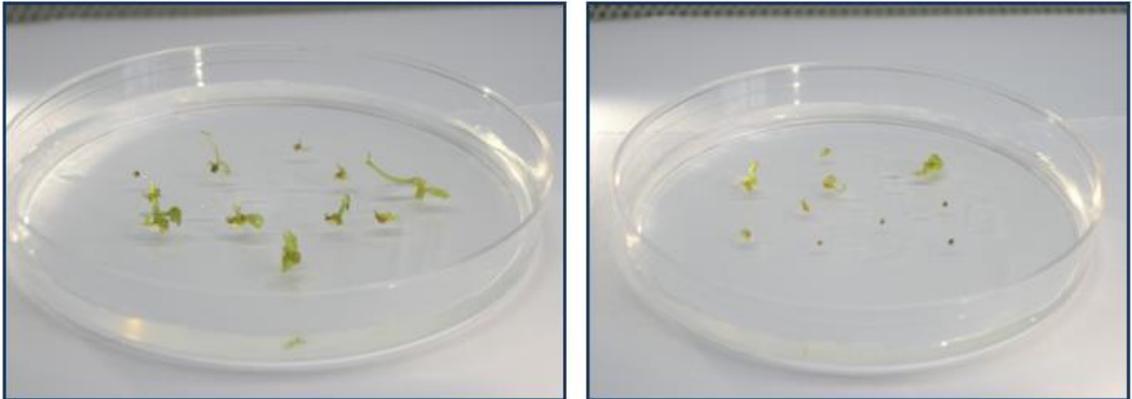


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

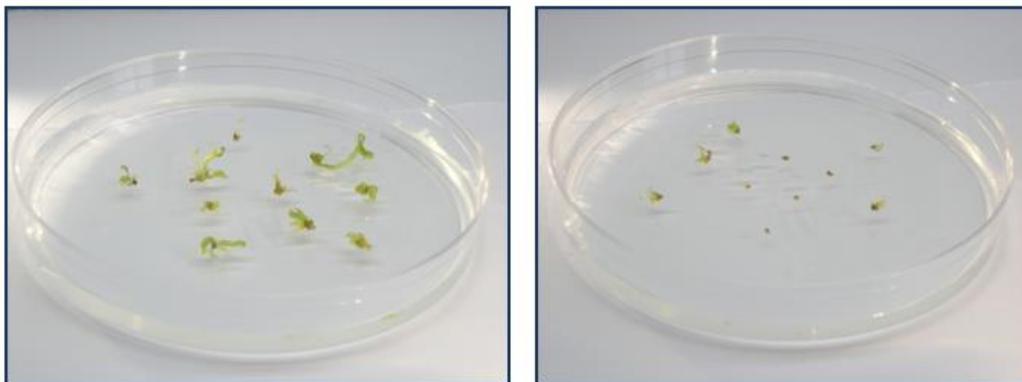
FIGURA N° 25 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
250  $\mu$ M DE PUTRESCINA



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 26 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
375  $\mu$ M DE PUTRESCINA



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 27 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 50 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO

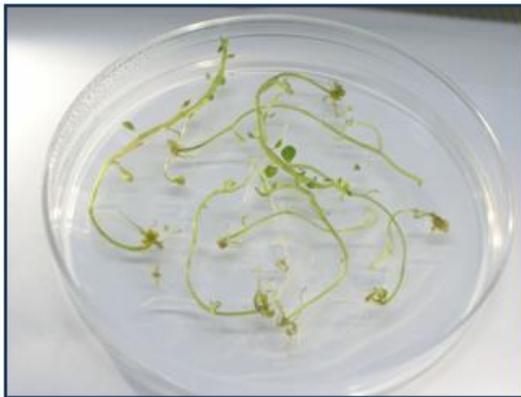


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 28 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 100 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO

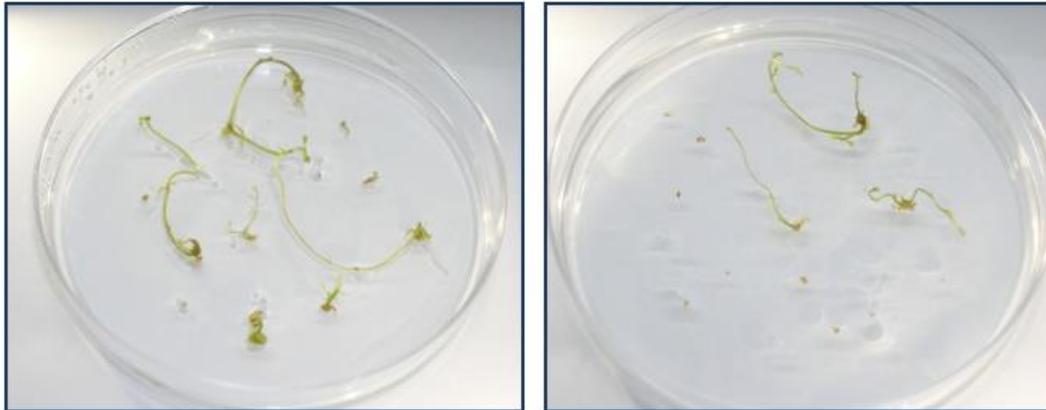


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

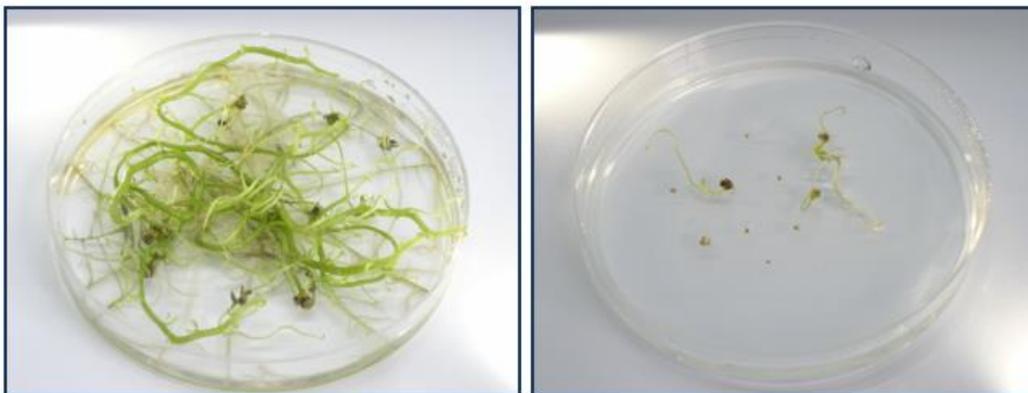
FIGURA N° 29 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 150 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 30 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
50 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 31 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
100 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 32 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
150 mg/L DE ÁCIDO ASCÓRBICO

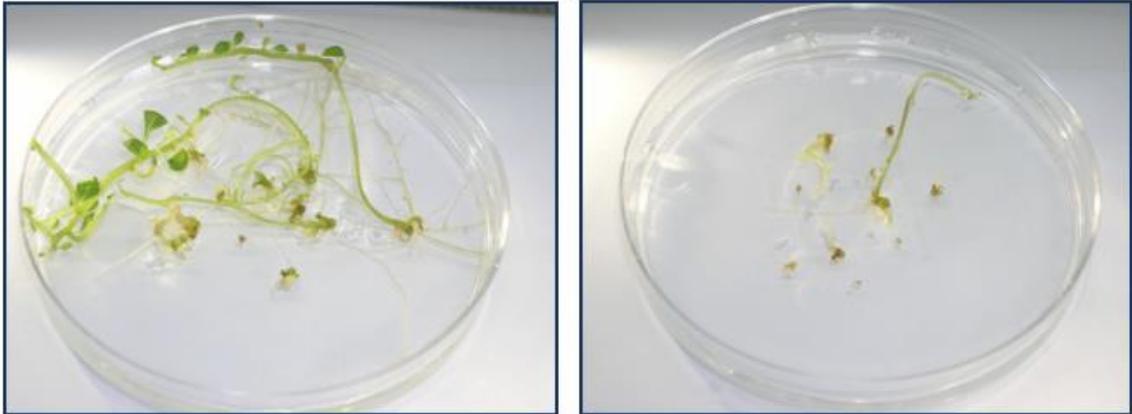


**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

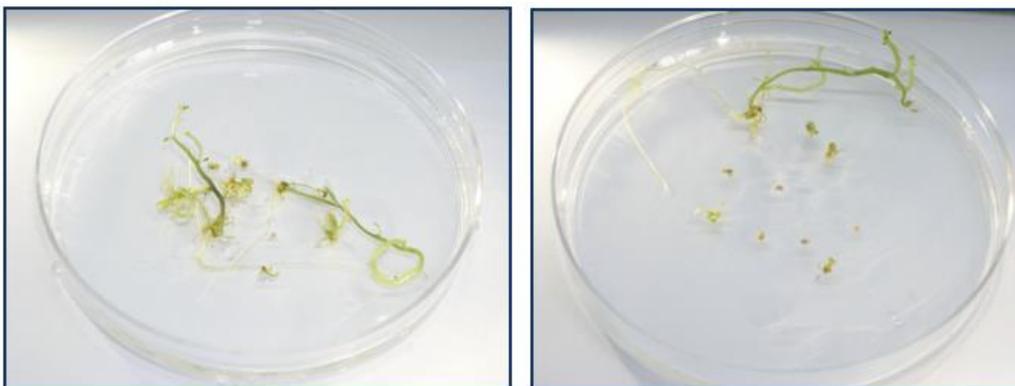
FIGURA N° 33 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 5 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 34 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 10 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



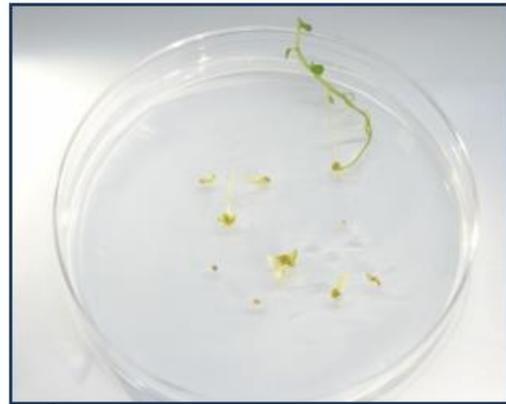
**Muestra No Congelada**

**Muestra Congelada**

FIGURA N° 35 MUESTRAS DE LA VARIEDAD CCOMPIS CRIOPRESERVADA  
CON 15 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 36 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
5 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 37 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
10 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**

FIGURA N° 38 MUESTRAS DE LA VARIEDAD TACNA CRIOPRESERVADA CON  
15 mg/L DE GLUTATIÓN REDUCTASA



**Muestra No Congelada**



**Muestra Congelada**