



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN BOTÁNICA

**ÁCIDO SALICÍLICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO,
INDUCTORES DE TOLERANCIA A CRIOGENIA EN
PLANTAS DE *Solanum tuberosum***

DIANA ROCÍO RUIZ SÁENZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

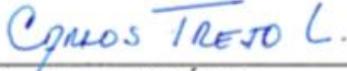
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: *Ácido salicílico y peróxido de hidrógeno, inductores de tolerancia a criogenia en plantas de Solanum tuberosum* , realizada por la alumna: **I.B.T. Diana Rocío Ruiz Sáenz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)	 DR. CARLOS TREJO LÓPEZ
DIRECTOR	 DR. HUMBERTO LÓPEZ DELGADO
ASESOR (A)	 DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA
ASESOR (A)	 DR. EBANDRO USCANGA MORTERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2021

ÁCIDO SALICÍLICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, INDUCTORES DE TOLERANCIA A CRIOGENIA EN PLANTAS DE *Solanum tuberosum* L.

Diana Rocío Ruiz Sáenz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

La criogenia se ha convertido en una herramienta importante para la obtención de materiales libres de virus y el almacenamiento a largo plazo de germoplasma vía *ex situ*. Factores diversos están involucrados en los procesos criogénicos que promueven estrés oxidativo y daños en el explante vegetal, así como la alteración de la actividad enzimática. En papa pretratamientos de AS y H₂O₂ han demostrado inducir tolerancia a frío y congelamiento, sin embargo, el uso de H₂O₂ y su función como señalizador es un área de investigación inexplorada en criogenia. El ácido salicílico en criopreservación ha incrementado los porcentajes de supervivencia y regeneración, además de permitir la obtención de plantas libres de virus en *Solanum tuberosum* L. El objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar el efecto del ácido salicílico (AS) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como moléculas señalizadoras e inductoras de tolerancia al estrés generado en procesos criogénicos en plantas de *Solanum tuberosum* L. así como los cambios que ocasionan ambas moléculas en el contenido de prolina, contenido de peróxido de hidrógeno, potencial hídrico, actividad enzimática de CAT y POX. Las evaluaciones fueron realizadas antes y después de criogenia. Adicionalmente se evaluó el potencial hídrico (Ψ_A) durante criogenia. La supervivencia en ambos clones, con ambas concentraciones, mostraron incremento en la supervivencia antes y después de criogenia. Durante el proceso de criogenia se obtuvo un aumento del potencial hídrico en ambos clones. Se observó un incremento en la actividad de prolina a las 12 horas en los tratamientos de peróxido de hidrógeno de ambos clones. Se obtuvo un incremento de la actividad de CAT y POX a las 72 horas después de criogenia. El contenido de peróxido disminuyó en las yemas provenientes de AS después de criogenia en ambos clones. El uso de SA y H₂O₂ puede inducir tolerancia al estrés originado en criogenia, incrementando los porcentajes de supervivencia sin importar el clon.

Palabras clave: Estrés oxidativo, criopreservación, antioxidantes, señalización redox, EROS.

**SALICYLIC ACID AND HYDROGEN PEROXIDE INDUCERS OF TOLERANCE TO
CRYOGENY IN PLANTS OF *Solanum tuberosum***

Diana Rocio Ruiz Saénz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Cryogenics has become an important tool for obtaining virus-free materials and long-term storage of germplasm via *ex situ*. Various factors are involved in the cryogenic processes that promote oxidative stress and damage to the plant explant as well as the alteration of the enzymatic activity. In potato, pretreatments of SA and H₂O₂ have been shown to induce tolerance to cold and freezing, however the use of H₂O₂ and its function as a signal is an unexplored area of research in cryogenics. Salicylic acid in cryopreservation has increased survival and regeneration percentages in addition to obtaining of virus-free plants in *Solanum tuberosum* L. The objective of this research was to study the effect of salicylic acid (SA) and hydrogen peroxide (H₂O₂), as signal molecules induced of tolerance to stress generated in cryogenic processes in *Solanum tuberosum* L. plants as well as the changes that they cause. Both molecules in proline content, hydrogen peroxide content, water potential, enzymatic activity of CAT and POX. The evaluations were carried out before and after cryogenics, additionally the water potential (Ψ_A) was evaluated during cryogenics. Survival in both clones with both concentrations showed increased survival before and after cryogenics. During the cryogenic process an increase in the water potential was obtained in both clones. An increase in proline activity was observed at 12 hours in the hydrogen peroxide treatments of both clones. An increase in CAT and POX activity was obtained at 72 hours after cryogenics. The hydrogen peroxide content decreased in the buds from SA after cryogenic in both clones. The use of SA and H₂O₂ can induce tolerance to cryogenic, increasing survival rates regardless of the clone.

Keywords: Oxidative stress, cryopreservation, antioxidants, redox signaling, ROS.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la oportunidad y la salud para realizar mis estudios

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para hacer posible la realización de mi Posgrado.

Agradezco al Colegio de Postgraduados (COLPOS) por formarme y otorgarme el grado de M. en C.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias y Pecuarias (INIFAP) por haberme recibido en sus instalaciones y permitirme realizar mi investigación.

Al Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del INIFAP, Sitio Experimental Metepec, por brindarme el material vegetal, el espacio y los equipos para la elaboración de este proyecto de investigación.

A los integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, apoyo, tiempo y los conocimientos que me otorgaron.

Al Posgrado de Botánica y a todas las personas que amablemente me guiaron en el camino, administrativos, técnicos y compañeros.

Agradezco a los profesores que brindaron su tiempo, me compartieron su pasión y me enseñaron un nuevo mundo.

Agradezco al Dr. Humberto López Delgado por confiar en mí, por su apoyo, por su guía en el área de la investigación y por su amistad.

Agradezco al Dr. Carlos Trejo, por su entusiasmo como profesor, disponibilidad, consejos, asesorías como mi consejero en el Colegio de Postgraduados.

Agradezco a la Dra. Martha Elena Mora Herrera por su disposición para compartir su conocimiento, por sus consejos y por sus asesorías.

Agradezco al Dr. Ebandro Uscaga Mortera por su paciencia, tiempo, asesorías y conocimientos.

Agradezco de igual manera a la Técnica del Laboratorio Concepción Becerril Domínguez por el apoyo brindado en la parte experimental.

DEDICATORIA

Todo el trabajo y esfuerzo se lo dedico a mi familia, a mi padre Raúl Ruiz Almazán, a mi madre Manuela Saéñz Alvarado y a mi hermana Nancy Azucena Ruiz Saéñz, por brindarme su apoyo incondicional cada minuto de la realización de este Posgrado.

A mi tía Jesús Gabriela Saéñz Alvarado por ser un ejemplo de vida, por sus sabios consejos que nos dejó antes de partir.

A mis tías, tíos y demás familiares que contribuyeron de alguna manera.

A mis amigos que me apoyaron todos los días, Dede, Mon, Lu, Marlon, Martha, Moisés, Mar, Alexander, Minerva, Dheinos, Elia, Gigi y a todos mis demás amigos.

A mi novio Caliel Hernández Marín por ser mi terapeuta y no dejar que me rindiera en ningún momento.

A mi hermano Azrael que me ayudó en muchos momentos a superar obstáculos que creía imposibles.

Especialmente dedico esta tesis al chobino y a corima que cada noche me acompañaron durante largas horas de estudio.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos generales.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Descripción del cultivo de papa.....	5
4.1.1 Virus en el cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L.	6
4.1.2 Métodos empleados para la obtención de plantas libres de virus en <i>Solanum tuberosum</i> L.	7
4.2. Conservación genética de <i>Solanum tuberosum</i> L.	7
4.2.1. Conservación <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> L.	9
4.3. Métodos criogénicos (Criogenia)	9
4.3.1 Criopreservación	11
4.3.1.1 Método de deshidratación-crioplaca (D-Crioplaca).....	13
4.3.1.2 Criopreservación de <i>Solanum tuberosum</i> L.....	14
4.3.2 Crioterapia en <i>Solanum tuberosum</i> L.....	15
4.4 Estrés abiótico.....	16
4.4.1 Estrés a temperaturas bajas y ultrabajas	16
4.4.2 Estrés generado en criogenia.....	17
4.4.2.1 Deshidratación en procesos criogénicos	18
4.4.2.2 Potencial hídrico Ψ_A	19
4.5 Estrés oxidativo	19
4.5.1 Especies reactivas de oxígeno	20
4.5.2 Síntesis y función del peróxido de hidrógeno	21
4.6 Sistema antioxidante.....	22
4.6.1 Catalasa	23
4.6.2 Peroxidasa	23
4.7 Osmolitos.....	24

4.7.1. Prolina	25
4.8 Ácido salicílico	26
4.9 Ácido salicílico (AS) y su relación con el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	27
4.10 Efecto del ácido salicílico y peróxido de hidrógeno a temperaturas bajas	28
4.11 Uso de AS y H ₂ O ₂ en procesos criogénicos.....	29
5. JUSTIFICACIÓN	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1 Material biológico.....	33
6.2 Condiciones de cultivo	33
6.3 Medio de cultivo para propagación	33
6.4 Solución madre de Ácido Salicílico	34
6.5 Preparación de soluciones de Peróxido de hidrógeno para incubación.....	34
6.6 Incubaciones en Ácido Salicílico	34
6.7 Incubaciones en Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	35
6.8 Fases experimentales	35
6.9 Método de D-crioplaca en FII	36
6.10 Potencial hídrico en la deshidratación en criogenia	37
6.11 Supervivencia	38
6.12 Evaluaciones enzimáticas y de contenidos (CAT, POX, H ₂ O ₂ y Prolina)	39
6.13 Determinaciones enzimáticas de CAT y POX	39
6.14 Catalasa.....	39
6.15 Peroxidasa.....	40
6.16 Determinación de contenido de peróxido de hidrógeno	40
6.17 Prolina.....	41
6.18 Diseño Experimental	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1 Altura de la vitroplanta, número de entrenudos, longitud de la raíz y peso fresco en respuesta a la aplicación de ácido salicílico	42
7.2 Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina antes del proceso de criogenia en respuesta a pretratamiento de ácido salicílico	47
7.2.1 Actividad de la catalasa.....	47
7.2.2 Actividad de la peroxidasa	48
7.2.3 Contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	49
7.2.4 Contenido de prolina	50

7.3	Potencial hídrico en yemas de dos clones pretratados con ácido salicílico en la etapa de deshidratación en el método criogénico D-crioplaca	51
7.4	Supervivencia posterior a criogenia de dos clones pretratados con ácido salicílico	52
7.5	Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina a las 12 y 72h de regeneración después de criogenia en yemas de dos clones pretratados con ácido salicílico.....	53
7.5.1	Actividad de la catalasa.....	53
7.5.2	Actividad de la peroxidasa	55
7.5.3	Contenido de peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	57
7.5.4	Contenido de prolina	59
7.6	Altura de la vitroplanta, número de entrenudos, longitud de la raíz y peso fresco de vitroplantas en respuesta a la aplicación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	61
7.7	Efecto de pretratamientos de H ₂ O ₂ en la actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrogeno y prolina antes de someterse a criogenia	65
7.7.1	Actividad de la catalasa.....	65
7.7.2	Actividad de la peroxidasa	66
7.7.3	Contenido de peróxido de hidrógeno	67
7.7.4	Contenido de prolina	68
7.8	Potencial hídrico en yemas de dos clones pretratados con peróxido de hidrógeno, en la etapa de deshidratación en el método criogénico D-crioplaca.....	69
7.9	Efecto de pretratamientos de H ₂ O ₂ en la supervivencia a criogenia.....	70
7.10	Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina, a las 12 y 72h de regeneración después de criogenia con un pretratamiento de ácido salicílico	71
7.10.1	Actividad de la catalasa.....	71
7.10.2	Actividad de la peroxidasa	73
7.10.3	Contenido de peróxido de peróxido de hidrógeno	75
7.10.4	Contenido de prolina	77
8.	DISCUSIÓN	79
8.1	Evaluación del efecto del ácido salicílico en parámetros de crecimiento en <i>Solanum tuberosum</i> L.....	79
8.2	Evaluación del efecto de ácido salicílico en la supervivencia en <i>Solanum tuberosum</i> L....	80
8.3	Efecto del Ácido Salicílico en la actividad enzimática la CAT, la POX y los contenidos de H ₂ O ₂ y Pro antes de criogenia	82
8.4	Efecto del pretratamiento de Ácido Salicílico en <i>Solanum tuberosum</i> L. en el potencial hídrico en la deshidratación en el método criogénico D-crioplaca	84

8.5 Efecto del pretratamiento de AS en <i>Solanum tuberosum</i> L. en la CAT, la POX, contenidos de H ₂ O ₂ y Pro, después de criogenia	86
8.6 Evaluación del efecto de peróxido de hidrógeno en parámetros de crecimiento en <i>Solanum tuberosum</i> L.....	88
8.7 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en la supervivencia en <i>Solanum tuberosum</i> L. antes de someterse a criogenia	89
8.8 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en la actividad enzimática de la CAT y de la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina en <i>Solanum tuberosum</i> L. antes de someterse a criogenia.....	91
8.9 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en el potencial hídrico en <i>Solanum tuberosum</i> L. antes de someterse a criogenia	93
8.10 Efecto del pretratamiento de ácido salicílico en <i>Solanum tuberosum</i> L. en la actividad enzimática de la CAT y la POX, contenidos de peróxido y prolina en dos tiempos de regeneración después de criogenia (12 y 72 h de regeneración)	95
9. CONCLUSIONES	100
10. LITERATURA CITADA	102
ANEXOS	127

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Efecto de la presencia de ácido salicílico en la altura de la vitroplanta, en 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).	43
Figura 2. Efecto de la presencia de ácido salicílico en la longitud de raíz de las vitroplantas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	44
Figura 3. Efecto de la presencia de ácido salicílico en el peso fresco de las vitroplantas en 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	45
Figura 4. Efecto de la presencia de ácido salicílico en el número de entrenudos de las vitroplantas en 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	46
Figura 5. Efecto del ácido salicílico en la actividad de catalasa (CAT), antes de criogenia en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	47
Figura 6. Efecto del ácido salicílico en la actividad de peroxidasa (POX), antes de criogenia en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	48
Figura 7. Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), antes de criogenia en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm el E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha =0.05$).	49

Figura 8.	Efecto del ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro), antes de criogenia en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	50
Figura 9.	Efecto del ácido salicílico en el potencial hídrico (YA) después de la deshidratación durante criogenia en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	51
Figura 10.	Efecto del ácido salicílico en supervivencia después de criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 72 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha = 0.05$).	52
Figura 11.	Efecto del ácido salicílico en la actividad de catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	53
Figura 12.	Efecto del ácido salicílico en la actividad de catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	54
Figura 13.	Efecto del ácido salicílico en la actividad de peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	55
Figura 14.	Efecto del ácido salicílico en la actividad de peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	56

Figura 15.	Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha = 0.05$).	57
Figura 16.	Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	58
Figura 17.	Efecto del ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha = 0.05$).	59
Figura 18.	Efecto de ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	60
Figura 19.	Efecto de la incubación en H ₂ O ₂ en la altura de la vitroplanta en 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H ₂ O ₂ y sembrados en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	61
Figura 20.	Efecto de la incubación en H ₂ O ₂ en la longitud de la raíz de las vitroplantas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H ₂ O ₂ y sembrados en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	62
Figura 21.	Efecto de la incubación en H ₂ O ₂ en el peso fresco de las vitroplantas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H ₂ O ₂ y sembrado en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).	63

Figura 22.	Efecto de la incubación en H ₂ O ₂ en el número de entrenudos de vitroplantas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. de 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H ₂ O ₂ y sembrado en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	64
Figura 23.	Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de catalasa (CAT), antes de criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días posteriores a la incubación en H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	65
Figura 24.	Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de peroxidasa (POX), antes de criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días posteriores a la incubación en H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	66
Figura 25	Efecto del peróxido de hidrógeno, en el contenido de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) antes de criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días posteriores a la incubación en H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	67
Figura 26.	Efecto del peróxido de hidrógeno en el contenido de prolina (Pro), antes de criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a los 30 días posteriores a la incubación en H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	68
Figura 27.	Efecto del tratamiento de peróxido de hidrógeno en el potencial hídrico (Ψ_A) después de la deshidratación durante criogenia, en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	69
Figura 28.	Efecto del peróxido de hidrógeno en la supervivencia después de criogenia de yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. Yemas provenientes de tratamientos de H ₂ O ₂ , diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas por 3 días. Las barras representan el promedio de 72 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha = 0.05$)	70
Figura 29.	Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de <i>Solanum tuberosum</i> L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H ₂ O ₂ , diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)	71

- Figura 30.** Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **72**
- Figura 31.** Efecto del peróxido del hidrógeno en la actividad de peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **73**
- Figura 32.** Efecto del peróxido del hidrógeno en la actividad de peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **74**
- Figura 33.** Efecto de peróxido del hidrógeno en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **75**
- Figura 34.** Efecto de peróxido del hidrógeno, en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **76**
- Figura 35.** Efecto de peróxido del hidrógeno en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) **77**

Figura 36.

Efecto de peróxido del hidrógeno en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$)

78

1. INTRODUCCIÓN

La criogenia se ha convertido en una herramienta importante para la obtención de materiales libres de virus y para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma vía *ex situ*. Factores diversos están involucrados en los procesos criogénicos que promueven estrés y daños en el explante vegetal, incluidos cambios en la estructura celular, deterioro de la membrana plasmática y alteración de la actividad enzimática (Wen *et al.*, 2010) y generación de estrés oxidativo. Una producción sin control de especies reactivas de oxígeno (EROS) se conoce que causa reducción en la regeneración de explantes criopreservados y muerte celular después del descongelamiento. Las EROS se producen en varias rutas del metabolismo celular (Foyer *et al.*, 1994).

Cuando la producción de EROS es mayor que los antioxidantes, esto resulta en el estrés oxidativo. La producción de EROS es controlada por el sistema antioxidante enzimático conformado por superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y el sistema antioxidante no enzimático incluidos ácido ascórbico (AsA) y glutatión (GHS). El sistema antioxidante transforma a las EROS a especies menos reactivas, reduciendo la concentración y deteniendo la producción de subproductos tóxicos de los iones metálicos e inhibiendo las complejas reacciones en cadena de los radicales (Foyer *et al.*, 1994). En bajas concentraciones las EROS son mensajeros primarios, especialmente el (H_2O_2) el cual interviene y desencadena toda una compleja cadena de señalización que induce tolerancia en las plantas en condiciones de estrés (Foyer *et al.*, 1994).

Para evitar los daños por la sobreproducción de las EROS durante criogenia, en la fase previa se adicionan moléculas con capacidad antioxidante o función de elicitador (Lynch *et al.*, 2011). El ácido salicílico (AS) en criopreservación ha incrementado los porcentajes de supervivencia y regeneración en especies como *Vitis vinifera* (Pathirana *et al.*, 2016), *Melia azedarach* (Bernard *et al.*, 2002) y *Solanum tuberosum* L. (Ayala-Hernandez *et al.*, 2019). En crioterapia se ha adicionado AS para la obtención de plantas libres de virus, así como para incrementar los porcentajes de supervivencia en *Vitis vinifera* y *Solanum tuberosum* L. (Pathirana *et al.*, 2016; Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019). El AS y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son dos moléculas

importantes en los mecanismos de señalización en cascada y ambos inducen tolerancia en plantas a condiciones de estrés abiótico, reduciendo los efectos negativos ocasionados por temperaturas bajas a través de mecanismos enzimáticos (Dat *et al.*, 2000). En papa, pretratamientos de AS y H₂O₂ han demostrado inducir tolerancia a frío y congelamiento (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006; López-Delgado *et al.*, 2018). En criogenia aplicada a papa, tratamientos de AS en la fase de precultivo mostraron tener efectos en la supervivencia, en la obtención de plantas libres de virus y efectos fisiológicos en la fase de regeneración (Ayala-Hernández *et al.*, 2019; Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019). En criogenia la generación de EROS durante todo el proceso y su relación con el sistema antioxidante ha sido estudiado, centrándose en los daños que producen o su rol en la muerte celular (Lynch *et al.*, 2011; Georgieva *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2019).

El H₂O₂ y su función como señalizador es un área de investigación inexplorada en criogenia. Hasta el momento la aplicación de H₂O₂ se ha realizado únicamente en la especie de *Celosia plumosa*, donde se encontró que tratamientos de peróxido de hidrógeno adicionados en la fase de carga pueden inducir cambios enzimáticos y aumentar los porcentajes de supervivencia; por tanto, inducir tolerancia a criogenia (Li *et al.*, 2019). Evaluar el efecto de pretratamientos como AS y H₂O₂, así como los cambios que ocasionan en contenido de prolina, contenido de peróxido de hidrógeno, potencial hídrico, actividad enzimática de CAT y POX, permitirá entender mejor los mecanismos posiblemente relacionados con la tolerancia a criogenia y el aumento en los porcentajes de supervivencia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

- 1) Evaluar la relación entre la inducción de tolerancia a estrés por criogenia mediante ácido salicílico y enzimas antioxidantes en *Solanum tuberosum* L.
- 2) Evaluar el efecto de peróxido de hidrógeno en la inducción de tolerancia a estrés por criogenia en *Solanum tuberosum* L. y la relación con enzimas antioxidantes.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la actividad antioxidante enzimática de catalasa y peroxidasa en plantas de *Solanum tuberosum* L. pretratadas con ácido salicílico o peróxido de hidrógeno en criogenia.
- 2) Determinar los contenidos de peróxido de hidrógeno y prolina en plantas de *Solanum tuberosum* L. pretratadas con ácido salicílico o peróxido de hidrógeno en criogenia.
- 3) Determinar el potencial hídrico en plantas de *Solanum tuberosum* L., en plantas pretratadas con ácido salicílico y peróxido de hidrógeno durante la etapa de deshidratación en criogenia.

3. HIPÓTESIS

Si el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno participan en respuestas comunes de tolerancia a estrés en *Solanum tuberosum* L. y el ácido salicílico induce tolerancia a criogenia en *Solanum tuberosum* L., por lo tanto, el peróxido de hidrógeno podría inducir tolerancia al estrés por temperaturas ultrabajas. Si el peróxido de hidrógeno induce respuesta a la tolerancia a temperaturas de congelamiento, entonces podría inducir tolerancia a temperaturas ultrabajas, pretratamientos de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en plantas de *Solanum tuberosum* L. inducirán cambios en la actividad enzimática antioxidante de CAT y POX al igual que en los contenidos de peróxido de hidrógeno y prolina asociados a tolerancia al estrés por criogenia.

La deshidratación inducida por 90 min, durante el proceso criogénico estará asociado a un valor de potencial hídrico (Ψ_A) constante, estable y reproducible.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Descripción del cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Solanaceae*, con 90 géneros y 2800 especies. *Solanum tuberosum* se divide principalmente en dos subespecies: a) la subespecie andígena, la cual es una especie diploide adaptada a condiciones de días cortos, crece principalmente en altitudes Andinas; y b) la subespecie *tuberosum*, que es una papa tetraploide la cual se cultiva en todo el mundo. Se reconocen 8 especies cultivadas y 228 especies silvestres, divididas en 21 series taxonómicas, incluidas 19 series portadoras de tubérculos y dos series no tuberosas (Spooner *et al.*, 2005). La clasificación taxonómica de la papa descrita por Spooner *et al.*, 2005, es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridiplantae*

División: Traqueofita

Subdivisión: Espermatofitas

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum* L.

Solanum tuberosum L. es una planta perteneciente a las herbáceas, la cual está formada por dos partes principalmente: a) la sección aérea la cual consta de tallos principales y secundarios, hojas, flores, frutos; y b) la sección subterránea conformada por la raíz, estolones, tubérculos. (Coutiño-Magdaleno *et al.*, 2018). En la parte aérea; la planta presenta un color marrón verdoso (Sifuentes *et al.*, 2013), el tallo es grueso, fuerte y angulado, al principio es erecto y posteriormente postrado. El tallo puede alcanzar una altura de entre 0.5 y 1 m. Posee hojas compuestas con siete foliolos lanceolados y pilosos, las flores tienen una forma estrellada con pétalos fusionados de colores blanco, rosa o violetas con un centro amarillo, en lo referente al fruto es verde que asemeja a un tomate pequeño y puede llegar a poseer alrededor de 400 semillas (Andrade *et al.*, 2015;

Coutiño-Magdaleno *et al.*, 2018). En la parte subterránea la raíz está compuesta por varias raíces adventicias las cuales poseen largas y delgadas ramificaciones. Su mayor incremento se da en los primeros 0.20 m de profundidad, extendiéndose lateralmente de 0.30 a 0.60 m (Andrade *et al.*, 2002; Coutiño-Magdaleno *et al.*, 2018). El tubérculo se forma a partir de un tallo lateral que crece en dirección positiva gravitropicamente llamado estolón el cual presenta una zona meristemática subapical, formándose generalmente entre 35 y 45 días después de la siembra (Coutiño-Magdaleno *et al.*, 2018; Zárate-Polanco *et al.*, 2014). El tubérculo se utiliza en consumo humano, alimentos procesados, en diversas actividades industriales y como tubérculo semilla (Kloosterman *et al.*, 2013).

El cultivo de *Solanum tuberosum* L. posee el tercer lugar en término de importancia agroalimentaria mundialmente con una producción total de 365 millones de toneladas por año (FAOSTAT, 2021), después del arroz y el trigo, su rendimiento de materia seca y proteína por hectárea es mayor que el de los principales cereales (Andrade *et al.*, 2002). Las papas contienen proteínas de alta calidad, así como todos los aminoácidos esenciales y vitamina C (Zárate-Polanco *et al.*, 2014). En México, el cultivo de papa está entre los seis cultivos de mayor importancia nutricional. Por su alto rendimiento, resistencia y características agronómicas, ha sido ampliamente sembrado en 19 estados del país, desde Baja California hasta Chiapas (Andrade *et al.*, 2002).

4.1.1 Virus en el cultivo de *Solanum tuberosum* L.

El cultivo de *Solanum tuberosum* L. es atacado por diversos agentes patogénicos como bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios y virus causantes de diversas enfermedades (O' Brien y Rich, 1976). Los virus de papa producen un alto porcentaje en la producción y en el rendimiento (Frankham *et al.*, 2017). En México los virus presentes son: el Virus X de la papa (PVX), Virus Y de la papa (PVY), Virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), Virus M de la papa (PVM) y Virus S de la papa (PVS) (Salomón *et al.*, 2004). Los virus atacan principalmente organelos celulares para su replicación, también llamados viroplasma (cloroplastos, mitocondrias, el núcleo, entre otros), volviendo difícil su eliminación al transmitirse de una generación vegetativa a otra, provocando daños tanto fisiológicos y metabólicos (Escudero *et al.*, 2016). Por este motivo se

requiere del uso de herramientas biotecnológicas que permitan la obtención de plantas libres de virus para un mantenimiento, distribución y almacenamiento de material genético de interés.

4.1.2 Métodos empleados para la obtención de plantas libres de virus en *Solanum tuberosum* L.

Las herramientas biotecnológicas empleadas comúnmente para la obtención de plantas libres de virus en diversos cultivos y en papa, se presentan a continuación: el cultivo de meristemas es la técnica cuyo fundamento es la obtención de células meristemáticas con baja o nula presencia de virus (Faccioli, 2001; Kabir *et al.*, 2010; Ramgareeb *et al.*, 2010), la quimioterapia mediante la adición de antivirales (Hsu *et al.*, 2000; Matthews 1953; Skiada *et al.*, 2009), la electroterapia a través de la aplicación de corriente eléctrica (O'nofre *et al.*, 2018), la termoterapia que consiste en mantener plantas o parte de ellas en temperaturas entre 35 °C y 54 °C (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016; López-Delgado *et al.*, 1998; 2004; Panattoni *et al.*, 2013) y la crioterapia basada en la aplicación de temperaturas ultrabajas (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019; Wang y Valkonen, 2008; 2009 a, b).

Una de las desventajas que tienen en común todas las técnicas descritas anteriormente, es la obtención de bajos o nulos porcentajes de supervivencia, inducida por el tipo y tamaño de explante, tipo y concentración del virus, además de la susceptibilidad de diversas especies al estrés generado a lo largo del proceso (Sánchez *et al.*, 1991). Sin embargo, la aplicación de tratamientos en la fase previa en cualquiera de estas técnicas ayuda a mejorar los porcentajes de eliminación de virus. Como se ha demostrado en papa mediante el uso de AS y H₂O₂ en termoterapia y crioterapia, para incrementar la supervivencia y el número de plantas libres de virus de PVX y PVS (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016; López-Delgado *et al.*, 1998; 2004; Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019). Mejorando su calidad fitosanitaria para su multiplicación o almacenamiento en bancos de germoplasma cumpliendo con normas oficiales (NOM-025-FITO-2000; 2000).

4.2. Conservación genética de *Solanum tuberosum* L.

Hoy en día la conservación de recursos vegetales ha cobrado relevancia a nivel mundial como consecuencia del cambio climático y la destrucción de ecosistemas, lo que conduce a la pérdida de la diversidad genética vegetal. El mejoramiento genético de cultivos, busca individuos con caracteres de interés para su conservación de manera *in situ* o *ex situ*. La conservación *in situ* es aquella que se realiza protegiendo el hábitat natural, teniendo como principal desventaja la pérdida de material genético por el cambio climático; recurriéndose así, como principal alternativa, a la conservación *ex situ* (Fernández y Gutiérrez, 2012).

La conservación *ex situ*, es la conservación de materiales fuera de su hábitat natural, en zonas de cultivo especializadas, invernadero o en condiciones *in vitro*. Las metodologías de conservación utilizadas para resguardar semillas recalcitrantes se basan en técnicas de cultivo *in vitro*, a fin de evitar la pérdida de cualquier germoplasma debido a factores bióticos y abióticos (Panis y Lambardi, 2005). Los métodos *in vitro* de conservación de recursos genéticos se clasifican en dos categorías: (1) procedimientos de crecimiento reducido, donde las accesiones de germoplasma se mantienen como tejidos o plántulas vegetales en medios nutritivos, brindando opciones de almacenamiento a corto y mediano plazo; y (2) crioconservación, donde los materiales vegetales son almacenados en nitrógeno líquido (NL) para su resguardo a largo plazo (Engelmann, 2004; Engelmann y Engels, 2002).

En papa la semilla botánica tiene una alta tasa de variabilidad genética y una tasa baja de germinación, por lo cual se utiliza la multiplicación asexual y clonar de manera vegetativa, en bancos de campo con colecciones *in situ* y *ex situ* (Corlett, 2017). La forma más eficiente de conservación de *Solanum tuberosum* L. es en condiciones *in vitro*, ya que presenta ventajas significativas sobre las otras formas de conservación de materiales genéticos, al poder establecerse el cultivo en condiciones fitosanitarias óptimas, conservándose un gran número de accesiones en un espacio reducido y con diferentes tiempos de almacenamiento (Fernández y Gutiérrez, 2012); se puede realizar a corto plazo utilizando técnicas de cultivo de tejidos, a mediano plazo en bancos de germoplasma en condiciones de crecimiento mínimo y a largo plazo mediante protocolos criogénicos (López-Delgado *et al.*, 1998; Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

4.2.1. Conservación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L.

La micropropagación continua, es un tipo de conservación de germoplasma de *Solanum tuberosum* L., con periodos cortos de 4 semanas aproximadamente entre cada subcultivo (Macgayver *et al.*, 2015), útil para el aumento de una población a partir de pocos individuos para su resguardo a mediano o largo plazo. La conservación de los explantes a mediano plazo tiene una duración de 6 meses a 2 años en cultivo *in vitro*, en condiciones de crecimiento mínimo, con medios adicionados con agentes osmóticos como manitol, sorbitol, polietilenglicol (García-Águila *et al.*, 2007), y temperaturas bajas (Macgayver *et al.*, 2015) almacenados en bancos de germoplasma, centros de recursos genéticos o bien colecciones privadas a lo largo del mundo (Engelmann y Engels, 2002).

La conservación de germoplasma a largo plazo es aquella donde partes vegetales con células meristemáticas se conservan en condiciones de congelamiento para su almacenamiento durante largos periodos, comprenden desde años hasta décadas (Benson, 2008). En 1995 el CIP inicio la criopreservación con el método de vitrificación desarrollado por Steponkus (1992), con 200 cultivares de papa con diferente poliploidia y el 75% de estos cultivares mostró regeneración exitosa. También se probaron otros métodos como encapsulación-deshidratación y métodos de goteo. Los cuales permitieron el resguardo de 960 accesiones en un tanque de nitrógeno líquido (NL) con 130 L reduciendo el costo de almacenamiento (Golmirzaie *et al.*, 1999). Hasta convertirse el día de hoy en rutinas aplicadas en diversos institutos que poseen colecciones criopreservadas de papa en Alemania, Japón, Perú y México (Kaczmarczyk *et al.*, 2011).

4.3. Métodos criogénicos (Criogenia)

Los métodos criogénicos (criogenia), son un conjunto de técnicas utilizadas para mantener un material en un punto de congelación utilizando el NL como medio de enfriamiento. Estos se basan en la eliminación de toda el agua congelable en los tejidos mediante deshidratación física u osmótica, seguida de una exposición a temperaturas bajas y ultrabajas. Dentro de los métodos criogénicos se incluyen la criopreservación y la crioterapia cuyo tronco común es la aplicación de las mismas metodologías, que permitan alcanzar ambos objetivos.

Las técnicas de criopreservación se clasifican en: a) clásicas, las cuales iniciaron su desarrollo en los años 70 (Kantha, 1985); b) técnicas nuevas, constituidas por la encapsulación-deshidratación (Reed *et al.*, 2005), la vitrificación (Uragami *et al.*, 1989), la encapsulación-vitrificación (Uragami *et al.*, 1989), deshidratación en crioplaca (Sakai, *et al.*, 1991) o vitrificación en crioplaca (Yamamoto *et al.*, 2012; Niino y Arizaga 2015), adicionalmente estas técnicas son aplicables en crioterapia.

El éxito de los procesos criogénicos está en función de: la condición del tejido donador, condiciones de cultivo, uso de osmoprotectores o crioprotectores, congelamiento, descongelamiento y condiciones de regeneración (Mustafa *et al.*, 2011). Estos factores tienen un impacto directo en la capacidad de supervivencia y regeneración del material vegetal que se somete a estos procesos. El tipo de explante y tamaño adecuado, influye en el éxito de la criogenia debido a que este tipo de explantes son más aptos para este proceso (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). En el caso de crioterapia se recomienda que las plantas infectadas solo tengan la presencia de un virus, ya que algunos virus actúan sinérgicamente afectando gravemente a los tejidos vegetales (Wang y Valkonen, 2009).

El uso de una aclimatación previa (exposición a temperaturas bajas), puede ser una alternativa para el incremento de los porcentajes de supervivencia y regeneración al inducir moléculas señalizadoras, con la finalidad de activar mecanismos de tolerancia para el estrés posterior a criogenia (Englemann, 2000; 2004). Los porcentajes de regeneración de los explantes han mostrado un aumento aún de especies no tolerantes, utilizando la aclimatación (Benson, 2008). Mecanismos que posiblemente se desencadenan son la acumulación endógena de moléculas asociadas al frío como son: el ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), acumulación de azúcares, producción de osmolitos y activando sistemas enzimáticos (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). Moléculas señalizadoras pueden adicionarse exógenamente en esta fase de cultivo para el incremento de la supervivencia y regeneración (Lynch *et al.*, 2011). El AS en criopreservación ha incrementado los porcentajes de supervivencia y regeneración en especies como *Vitis vinifera* (Pathirana *et al.*, 2016), *Melia azedarach* (Bernard *et al.*, 2002) y *Solanum tuberosum* L. (Ayala-Hernandez *et al.*, 2019). En crioterapia se ha adicionado AS para la obtención

de plantas libres de virus, así como para incrementar los porcentajes de supervivencia en *Vitis vinífera* y *Solanum tuberosum* L. (Pathirana *et al.*, 2016; Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019).

Los osmoprotectores en la criogenia son soluciones con una alta cantidad de osmolitos que ayudan a la reducción de agua disponible en los tejidos vegetales. Los crioprotectores más comunes son dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), glicerol, sacarosa, sorbitol y manitol (Rajasekharan, 2006). Un ejemplo de su función es la adición de glicerol, el cual penetra a la membrana celular, reduciendo la concentración de la salina y el volumen de agua congelada. En contraste con la sacarosa la cual solo penetra la pared celular y extrae el agua de la célula durante la deshidratación, protegiendo la membrana plasmática (Kaczmarczyk *et al.*, 2011).

El proceso de congelamiento en criogenia puede llevarse a cabo paulatinamente reduciendo la temperatura en intervalos, o bien, de forma rápida al sumergir directamente el material precultivado y crioprotegido en NL. Esto a fin de evitar la nucleación del hielo y con ello la lisis celular, reduciendo los porcentajes de supervivencia y regeneración (Benson, 2008). El descongelamiento es el punto de la criogenia donde por medio de soluciones con altas concentraciones de sacarosa se evade la recrystalización del hielo por el cambio térmico, mismo que puede llevarse a cabo en presencia de soluciones de sacarosa 0.8 - 1.2 M o descongelándolos en agua a 40 °C (Hirai y Sakai, 1999) cabe señalar que en la fase de recuperación o regeneración se deben considerar factores como la duración del subcultivo, medio, luz y temperatura de acuerdo al tipo de explante (Benson *et al.*, 2008; Kaczmarczyk *et al.*, 2009).

4.3.1 Criopreservación

La criopreservación se aplica para la conservación de tejidos y órganos diferenciados como polen, semillas, ejes embrionarios, ápices, embriones cigóticos y somáticos, lo cual permite mantener una estabilidad genética (Benson, 2008; González-Benito *et al.*, 2004).

Las primeras aplicaciones y estandarizaciones de los métodos criogénicos se dividían en dos de acuerdo con tipo de congelamiento: a) el enfriamiento en dos pasos, el cual consiste en una disminución de la temperatura mediante el uso de un sistema automatizado, usando una velocidad de enfriamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $-0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para transferirse a NL (Benson *et al.*, 1989); b) congelamiento es el enfriamiento ultrarápido, usando una velocidad de enfriamiento $360\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Towill y Bonnart 2003).

En la criopreservación los métodos más utilizados son: a) El *Método de vitrificación*; consiste en la solidificación de líquidos sin cristalización. Se aplica una solución de vitrificación de plantas 2 (PVS2), conformada por medio Murasigue y Skoog (MS; 1962) adicionado con sacarosa 0.4 M y una mezcla de crioprotectores (glicerol, etilenglicol y DMSO). En este método los explantes se precultivan en medio MS líquido suplementado con ácido giberélico (GA_3), sacarosa o manitol. Los explantes pasan por un tren de carga en soluciones de PVS2 (PVS2 al 20%; PVS2 al 60% PVS2 100%), con inmersión a NL de forma directa y la rápida. El descongelamiento se realiza de forma rápida a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio MS con sacarosa 1.2 M y la regeneración se llevó a cabo bajo luz difusa (fotoperíodo de 16h, aprox. $6\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio MS de regeneración semisólido (Sakai *et al.*, 1990).

b) El *Método de gota de DMSO (congelación por goteo)*. Se colocan los explantes en gotas de crioprotector colocadas en hojas de aluminio para su congelamiento y descongelamiento. Los explantes se aíslan e incuban en medio MS con 30 g/l de sacarosa, 0.5 mg/L de ribósido de zeatina, 0,2 mg/L de ácido giberélico (GA_3) y 0.5 mg/L de ácido indolacético (AIA). Se crioprotegen con medio MS (Murashigue y Skoog; 1962) y DMSO. El congelamiento se realiza directamente en NL y el descongelamiento rápido se lleva a cabo con gotas de agarosa (Schäfer-Menuhr *et al.*, 1994).

c) La *Vitrificación por goteo* combina elementos del método de gotas de DMSO y la vitrificación. Los esquejes se incuban en medio líquido MS que contiene GA₃, zeatina y AIA a 24 °C, se deshidratan en gotas de PVS2 sobre papel de aluminio y se colocan en crioviales preenfriados para su inmersión directa al NL. El descongelamiento se realiza de forma rápida en medio líquido con sacarosa. La regeneración se lleva a cabo en medio semisólido a ± 24 °C con subcultivos a medio sólido (Panta *et al.*, 2009).

d) La *Encapsulación / Deshidratación*, en este método los explantes se subcultivan en diversos medios enriquecidos, se suspenden en medio MS líquido libre de calcio con alginato de sodio, posteriormente se trasladan a medio líquido con cloruro de calcio para la formación de perlas de alginato. Se incuban en solución de sacarosa y deshidratan bajo el flujo de aire a temperatura ambiente. El congelamiento se realiza de forma rápida en NL, el descongelamiento se lleva a cabo de forma rápida en una solución de sacarosa 0.5 M y la regeneración se lleva a cabo en medio MS sólido (Fabre y Dereuddre, 1990)

e) *Encapsulación/Vitrificación*, esta metodología combina ciertos elementos de vitrificación y encapsulación/deshidratación. Los explantes se precultivan en medio MS sólido, se suspenden en medio MS sin calcio suplementado con alginato de sodio y sacarosa, transfiriéndose a medio MS con cloruro de calcio para su polimerización, se realiza la osmoprotección con medio MS que contiene sacarosa y glicerol, se lleva a cabo una deshidratación con solución PVS2, el congelamiento es directo en NL y el descongelamiento se realiza en presencia de sacarosa en un baño de agua a 38 °C

4.3.1.1 Método de deshidratación-crioplaca (D-Crioplaca)

Dos de los métodos más recientes para la crioconservación por deshidratación-vitrificación son los métodos de crioplaca V, dónde la deshidratación se realiza utilizando la solución de vitrificación PVS2, y el método de deshidratación crioplaca (D-crioplaca) que es recomendado para materiales que son sensibles a la solución PVS2 (Yamamoto *et al.*, 2012). En el método de D-crioplaca la deshidratación se consigue utilizando la corriente de aire de la cabina de flujo laminar o gel de sílice (Yamamoto *et al.*, 2015). La principal ventaja de estos métodos es la

manipulación más fácil y rápida de las muestras. El objetivo principal de estos métodos es que los explantes se adhieran a una lámina dura (crioplaca), que es reutilizable y posee una alta conductividad térmica sustituyendo el uso de hojas de aluminio; el uso de soluciones de carga (LS) o PVS2 es más sencillo, ya que con estos portadores la pérdida y lesiones del material vegetal se disminuye. La etapa de congelamiento se realiza mediante inmersión directa en NL y la solución de descongelamiento respectivamente, incrementando los porcentajes de regeneración y supervivencia. Las crioplasmas de aluminio diseñadas (37 mm x 7 mm x 0,5 mm con 10 o 12 pocillos) están hechas con aluminio de una pureza > 99.5 % y pueden colocarse en crioviales de 2 mL. Este método permite trabajar con un gran número de muestras al mismo tiempo, la manipulación es más sencilla y ha sido aplicado a una amplia variedad de especies de papa, incluidas algunas silvestres y variedades diploides como Inca-no-Mezame (Niino *et al.*, 2014, Yamamoto *et al.*, 2015).

4.3.1.2 Criopreservación de *Solanum tuberosum* L.

La criopreservación de papa se inició en el año 1977 (Bajaj *et al.*, 1977) con porcentajes bajos de supervivencia, pero los estudios realizados a lo largo del tiempo en *Solanum tuberosum* L. indican que tiene un punto crítico debido a las diversas respuestas entre diferentes genotipos, lo que se ve reflejado en las variantes entre los porcentajes de supervivencia y regeneración obtenidos, como resultado de la susceptibilidad a estos procesos criogénicos (Panta *et al.*, 2009; Kaczmarczyk *et al.*, 2008; 2011).

En los siguientes experimentos realizados en *Solanum tuberosum* L. utilizando diversos métodos, refleja los porcentajes de supervivencia y regeneración. En el método de *enfriamiento en dos pasos* se observaron porcentajes de regeneración de 9-18 % (Bajaj, 1977), 21-85 % (Henshaw *et al.*, 1985), 33-70 % (Towill, 1984) y 1 % (Benson *et al.*, 1989). La supervivencia reportada para el *método de vitrificación* es de *Solanum Andígena* 29 % (Golmirzaie y Panta, 2000) mientras en *Solanum tuberosum* L. 21.3-58 % (Kryszczuk *et al.*, 2006), 2.3-71 % (Zhao *et al.*, 2005) y de regeneración de 2.5-22 % (Barandalla *et al.*, 2003). Por el *método de goteo* se observó un 58 % de supervivencias en alrededor de 1000 accesiones (Kaczmarczyk, 2008). En el método de *vitrificación por goteo*, la supervivencia se reportó en los rangos de 8.8-55.5 % (Halmagyi *et al.*, 2005), 78.7-94.4 % (Kim *et al.*, 2006), 33.4-88.7 % (Yoon *et al.*, 2006). De acuerdo con Hirai y

Sakai (1999) la supervivencia en *Solanum tuberosum* L. por el método de *encapsulación-vitrificación* puede alcanzar hasta un 70 % en diversos cultivares.

El método de *encapsulación-deshidratación* es uno de los métodos más utilizado en rutinas de criopreservación y crioterapia; en el caso de este método Bouafia *et al.*, (1996) obtuvieron entre un 12-71 % de supervivencia, en comparación con el 32 % y el 61 % obtenidos por Benson *et al.*, (1994) y Harding y Benson (2001), respectivamente. Yamamoto *et al.*, (2015) reportaron un 76-100 % de supervivencia y regeneración.

Los bajos porcentajes obtenidos en las diversas metodologías en criopreservación se deben a múltiples factores, entre ellos el estrés oxidativo, el estrés osmótico y la respuesta propia del genotipo (Benson, 2008).

4.3.2 Crioterapia en *Solanum tuberosum* L.

Otro uso de la criogenia es la crioterapia, mostrado ser eficaz en la eliminación de ciertos fitopatógenos erradicándolos con la exposición de meristemos apicales a NL (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2003, 2009). En el caso de papa; Wang *et al.*, (2006) reportaron la eliminación del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) y el virus Y de la papa (PVY) por medio del método de encapsulación/deshidratación, encapsulación/vitrificación y goteo.

Pero al igual que en criopreservación el porcentaje de supervivencia regularmente es bajo, dependiendo de la concentración y tipo de virus presente, además que la regeneración no está asegurada, aunque exista un alto porcentaje de supervivencia (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2006). Ayala-Hernández *et al.*, (2019), obtuvieron incrementos de la supervivencia de entre un 2.17 a un 3.21 veces los valores de referencia en procesos criogénicos, mientras que Ruiz-Sáenz *et al.*, (2019) obtuvieron valores del 0-70 % en clones de papa sometidos a crioterapia, utilizando en ambos casos el método de encapsulación-deshidratación. Lynch *et al.*, (2011) sugieren el uso de pretratamientos para reducir el estrés abiótico generado en criogenia, con la finalidad de mejorar los porcentajes de supervivencia y regeneración.

4.4 Estrés abiótico

El término estrés (biótico o abiótico), es definido como cualquier factor ambiental que reduce la tasa de algún proceso fisiológico, ejemplificando: el crecimiento o la fotosíntesis por debajo de la tasa máxima que podrían alcanzar en condiciones normales de crecimiento (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Algunos de los tipos de estrés son: sequía, falta de nutrientes, metales pesados, inundación, salinidad (Sewelam *et al.*, 2016) y condiciones de temperaturas extremas (López-Delgado *et al.*, 1998; 2018; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006). El estrés abiótico tendrá efectos bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y estructuras diferentes, pero todos conducirán al estrés oxidativo y en casos extremos a la muerte celular (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

4.4.1 Estrés a temperaturas bajas y ultrabajas

La temperatura se considera un factor de estrés abiótico y es estudiado ampliamente al presentarse de forma global debido al cambio climático existente en las últimas décadas. El estrés generado por temperaturas bajas se puede dividir en estrés por frío y estrés por congelamiento. Al enfrentarse al estrés por temperaturas bajas, las plantas muestran variabilidad en la capacidad de desarrollar tolerancia al estrés generado por frío ($<0\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a la congelación ($0\text{ a }-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) dependiendo de la especie y el genotipo (Saleem *et al.*, 2020). Cada planta tiene un rango óptimo de crecimiento apropiado para su crecimiento y desarrollo. Los cultivos de hábitats cálidos exhiben síntomas de daños a temperaturas bajas, pero no de congelamiento, por ejemplo, como en *Zea mays*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Lycopersicum esculentum* y *Musa sp*, donde se observaron daños a la exposición a temperaturas entre $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$ (Sudesh, 2010), los daños por frío se ven a las pocas horas en reducción de la expansión de las hojas, clorosis o necrosis y daños en la membrana plasmática (Sudesh, 2010).

El estrés por congelamiento es resultado de una exposición a temperaturas menores a cero grados (Sakai y Larcher, 1987; Viswanathan *et al.*, 2007), la formación de hielo se puede llevar a cabo dependiendo de la velocidad de enfriamiento o por la velocidad de extracción de las moléculas de agua de las células vegetales (Yoshida y Uemura, 1990; Guy, 1990). Durante la

congelación extracelular, el hielo se congela fuera de las paredes celulares, mientras que los cristales de hielo se forman al iniciar el enfriamiento a temperaturas bajo cero. Esta congelación extracelular se caracteriza por la deshidratación celular, el crecimiento de cristales de hielo en la superficie externa, así como la contracción de su volumen celular a medida que sale por difusión el agua fuera de la célula. La cristalización del agua interna puede llevarse a cabo por nucleación o por la penetración de cristales de hielo externo durante la congelación intracelular (Guy, 1990). Existiendo múltiples respuestas entre especies y genotipos en la tolerancia a la congelación, la misma que se puede identificar, en las diferentes etapas de crecimiento o incluso dentro de la población (Sakai y Larcher 1987; Viswanathan *et al.*, 2007; Thomashow, 2001). Las plantas suelen preaclimatarse en condiciones subóptimas a las de su crecimiento normal para la producción endógena de moléculas de ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), especies reactivas de oxígeno (EROS), azúcares, osmolitos y la activación del sistema antioxidante enzimático para inducir la tolerancia a estrés por congelamiento (Salisbury y Ross, 1991). A temperaturas ultrabajas la generación de estrés presenta similitudes a lo mencionado en frío y congelamiento.

4.4.2 Estrés generado en criogenia

La criogenia es una técnica compleja, donde se presentan múltiples tipos de estrés abiótico, derivado de cada una de las fases que induce un tipo de estrés en específico. La fase de cultivo previo a criogenia, la disección del tejido y su siembra en condiciones de preaclimatización o con algún agente adicionado, lo cual conduce a cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos (Lynch *et al.*, 2011). La deshidratación se realiza en una o varias etapas de la criogenia, eliminando la máxima cantidad de agua disponible en el tejido, sin que pierda la estabilidad de las membranas, la deshidratación excesiva hace que la célula se plasmolice, en contraste con esto, las células poco deshidratadas conducirán a daños en la siguiente fase de la metodología (Tomashow 1998). El siguiente estrés corresponde a la exposición al ultra-congelamiento, similar a lo que se presenta en frío o congelamiento, en este se busca evitar la formación de cristales de hielo, en este punto de la metodología todos los procesos metabólicos de la célula se detienen, por lo tanto, el daño significativo es aquel que puede generarse en presencia de agua y su cristalización (Benson, 2008). En el descongelamiento es donde ocurren algunos de los efectos que podemos equiparar a los encontrados en congelamiento, ya que al descongelarse un explante de criogenia éste regresa a un estado metabólico activo (Rahmad *et. al.*, 2015; Danova *et. al.*, 2012). Un descongelamiento

inadecuado, puede conducir a la recristalización del agua, generándose así la muerte celular. Además de lo anteriormente descrito, el tejido vegetal debe evadir la foto oxidación en los primeros días de regeneración (Kaczmarczik *et al.*, 2012).

4.4.2.1 Deshidratación en procesos criogénicos

La deshidratación es la remoción de agua de los tejidos, en criogenia se presenta en una o más de las fases que constituyen a la metodología. La eliminación de agua se realiza en las primeras fases, antes del congelamiento mediante la adición de soluciones crioprotectantes, que ayudan a mantener la estabilidad de las membranas celulares y cuya función es aumentar la concentración de solutos, hasta que la solución líquida se vuelva cada vez más viscosa a medida que la temperatura disminuye, volviéndose así un sólido vítreo. Otra alternativa es mediante el uso de procesos físicos, como corrientes de aire y agentes desecantes como el sílica gel, cumpliendo ambas la misma función (Niino *et al.*, 2015). La eliminación del agua en las fases anteriores ayuda a evadir la formación de cristales de hielo en la célula (nucleación del hielo) que se forman con el cambio de estado líquido a sólido del agua al entrar en contacto con el NL (-196 °C), un control preciso de la eliminación del agua de los explantes, así como la prevención de las lesiones por toxicidad química o estrés osmótico durante la etapa de deshidratación se considera crítica para que el proceso criogénico sea exitoso. El tiempo óptimo de deshidratación depende de la especie y puede variar con el tamaño, la etapa y el estado morfológico del explante (Niino *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2015).

El tamaño de las células es un factor de estrés medular en la regeneración exitosa de los explantes sometidos a criogenia, derivado de que las células pequeñas y densas sobreviven mejor que aquellas vacuoladas y grandes, las cuales sufren mayores daños. La unión y presencia de todos estos factores de estrés generalmente provocan porcentajes reducidos o nulos de supervivencia o regeneración, la producción de daños en la membrana está ligada al estrés osmótico y relacionada con altas concentraciones de electrolitos y proteínas totales las cuales se originan después del proceso de descongelación (Snyman *et al.*, 2011; Niino *et al.*, 2015).

4.4.2.2 Potencial hídrico Ψ_A

La herramienta con la que se cuenta para expresar y medir el estado libre del agua o los líquidos en general es el potencial hídrico Ψ_A (Bieto y Talón, 2013). El Ψ_A puede expresarse en megapascales (MPa = 10 bares), atmósferas o bares (1 bar = 0.987 atm) y varía en forma directamente proporcional con los valores de energía libre presentes en el sistema. El Ψ_A se define como la cantidad de trabajo suministrado a una unidad de masa de agua “ligada” a los tejidos de una planta, para que pase esta de un estado de unión a uno de referencia ($\Psi=0$); a la misma temperatura y la presión atmosférica del sistema o bien como el diferencial entre la presión de turgencia ejercida en la célula vegetal contra la pared celular y la presión osmótica (Bieto y Talón, 2013; Taiz y Zeiger, 2006). El Ψ_A regula la capacidad de transporte de los metabolitos propios de la planta y su relación con los contenidos de agua dentro de la célula. Dentro de la transpiración de las hojas la dirección del Ψ_A dentro de la planta será siempre de mayor a menor (Zyalalov, 2004; Moreno, 2009). Cabe señalar que un estrés hídrico puede ocasionar una afectación en la capacidad de transporte electrónico debido a diversos factores de estrés (Flexas y Medrano 2002). De acuerdo con Osmond y Grace (1995) existe también una reducción de centros funcionales relacionados con la integridad de la denominada maquinaria fotosintética, proceso conocido como foto-inhibición crónica.

Es importante conocer a detalle que las relaciones hídricas de los tejidos pueden ayudar a mejorar la supervivencia de explantes en criogenia, si se tiene de referencia la cantidad de agua disponible en la célula, debido a que ayudaría a prevenir el daño causado por el encogimiento excesivo debido a una sobre deshidratación, daño que puede ser mecánico y de carácter reversible. El estudio de relaciones hídricas es relevante en los procesos criogénicos, ya que el estrés osmótico generado en estos procesos determina en gran medida la recuperación de los tejidos, ya que evita la formación de cristales de hielo, los cuales son letales para la célula (Engelmann, 2000).

4.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de EROS y el sistema antioxidante (Wang *et al.*, 2013), la presencia de EROS cumple un papel doble, bajas

concentraciones de estas funcionan como moléculas señalizadoras y a niveles superiores producen daños celulares e incluso la muerte. Las EROS a niveles altos inhibe la función de las enzimas y destruye las proteínas celulares, los ácidos nucleicos y los lípidos. Cuando las plantas están expuestas a condiciones ambientales desfavorables, la destrucción oxidativa ocurre cuando cambia el equilibrio entre la producción de las EROS y su desintoxicación a través del sistema antioxidante es parcial (Foyer y Noctor, 2005; Scandalios, 2005). El estrés oxidativo en niveles más altos de los basales, pero no superiores a niveles de señalización, desencadenan diversos procesos de la cascada de señalización, donde se activan diversos procesos bioquímicos y fisiológicos en el denominado sistema antioxidante (Peralta-Pérez *et al.*, 2012).

4.5.1 Especies reactivas de oxígeno

En todos los organismos vivos se producen moléculas con una alta capacidad de reacción, las EROS son una respuesta a factores de estrés abióticos o bióticos que en grandes concentraciones pueden dañar gravemente la célula (Carvajal, 2019; Gondim *et al.*, 2013; Saed-Moucheshi *et al.*, 2014; Gill y Tuteja, 2010; Che *et al.*, 2020). Las EROS se producen en diferentes partes de la célula, principalmente cloroplastos y mitocondrias, por medio de la fuga de electrones de las cadenas transportadoras de O_2 . Las oxidasas y peroxidasas ubicadas en el apoplasto; principal fuente de oxígeno originando el superóxido (O_2^-), mientras que por medio de la fotorrespiración se genera H_2O_2 en los peroxisomas (Gechev *et al.*, 2006; Halliwell, 2006). Las EROS tienen alta actividad de reacción y capacidad oxidante. Se pueden generar en varias partes de la célula como son la mitocondria y el retículo endoplasmático. Entre las EROS producidas se encuentra el ion O_2^- , el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el oxígeno en singulete (1O_2) (Lay *et al.*, 2014; Di Meo *et al.*, 2016; Gondim *et al.*, 2013). Todas las EROS son producidas a partir de la reducción del O_2^- , en una primera reducción produce radicales (O_2^-); posteriormente existe una dismutación enzimática (causada por la superóxido dismutasa SOD) o espontánea (al liberarse un electrón) donde se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este a su vez es transformado por medio de la reacción de Fenton en el radical hidroxilo (OH^\cdot) o eliminado por la catalasa o en el ciclo del ascorbato-glutati6n. La formaci6n del oxígeno en singulete (1O_2) se forma por efecto de la fotoactivaci6n (Khan *et al.*, 2018).

4.5.2 Síntesis y función del peróxido de hidrógeno

El H₂O₂ en un inicio era considerado únicamente como un metabolito celular tóxico (Azevedo-Neto *et al.*, 2005); diversos autores han demostrado que solo es tóxico en altas concentraciones y puede servir como una molécula señalizadora, además poseer una actividad antioxidante, ya que es el compuesto más estable de las EROS (Uchida *et al.*, 2002; Szechynska-Hebda *et al.*, 2012). Esta molécula no polar fue descubierta por Louis Jacques Thenars en el año de 1818, y utilizada principalmente como un producto industrial.

El H₂O₂ es considerado la molécula más estable de las EROS y se difunde a través de las membranas celulares por diversos canales (Neill *et al.*, 2002), formando radicales hidróxilo de vida media corta, los cuales reaccionan directamente con otras EROS y biomoléculas próximas a su origen, lo cual lo convierte en una molécula señal de transducción (Mori y Schroeder, 2004). El H₂O₂ se genera como respuesta a diversos estímulos, participa en la regulación de diversos procesos biológicos, además del remodelamiento vascular y el cierre estomático en las plantas. Posee una gran movilidad entre tejidos, además de servir como sustrato en varias reacciones y pueden ser utilizada como una molécula señalizadora en plantas (Khan *et al.*, 2019).

Se produce de forma natural en las plantas, encontrándose en concentraciones de condiciones óptimas (60 µM – 7 mM, dependiendo la especie) (Jiang y Zhang, 2001). El H₂O₂ posee una participación activa en diversas funciones fisiológicas de las plantas, además de ser un intermediario entre respuestas a diversos tipos de estrés, es considerada una molécula señalizadora en procesos en la aclimatación y en la tolerancia cruzada (Foyer *et al.*, 1997; Neill *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2002; Azevedo-Neto *et al.*, 2005; Gondim *et al.*, 2012; 2013).

El H₂O₂ es un importante regulador de transducción de señales en organismos eucariontes, cuando es producido durante el llamado estallido oxidativo tiene una función de molécula señal, la cual induce la transcripción de genes que posteriormente codifican en proteínas como lo son la fenilalanina amonioliasa (PAL), la glutatión-S-transferasa, enzimas para la biosíntesis de lignina, la Glutatión transferasa en la periferia celular y peroxidasa (Khan *et al.*, 2018). La conversión de H₂O₂ a H₂O por la ascorbato peroxidasa (APX) ocurre por la oxidación del ascorbato (ASC) a

monodehidro-ascorbato (MDA), que puede regenerarse por la monodehidro-ascorbato reductasa (MDAR) con NAD(P)H como reductor. El MDA puede dismutarse espontáneamente en dehidro-ascorbato (DHA), por la oxidación del glutatión (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG). Finalmente, la glutatión reductasa (GR) puede regenerar GSH a partir del GSSG, usando NAD(P)H como agente reductor. La glutatión reductasa (GR) también detoxifica H_2O_2 a H_2O utilizando al GSH como reductor. Así, las formas oxidadas del ASC y el GSH son conducidas a sus estados reducidos iniciales, cerrando el ciclo y previniendo así la acumulación de H_2O_2 (Khan *et al.*, 2018).

El H_2O_2 juega un papel importante en la transducción de señales de defensa en las plantas y podría inducir la expresión génica y la síntesis de proteínas a favor del mecanismo de tolerancia. (Apostol *et al.*, 1989; Burdon *et al.*, 1995; Karpinski *et al.*, 1999). Activando una compleja red de rutas metabólicas que intervienen en la catabolización por catalasa, en presencia de sustratos reductores por peroxidasas en el ciclo del ascorbato-glutatión (Khan *et al.*, 2018; Sofo *et al.*, 2015).

4.6 Sistema antioxidante

El sistema antioxidante en plantas tiene como función prevenir la oxidación de otras moléculas a medida que se producen EROS por las reacciones de oxidación, las cuales conducen a daños o muerte celular. El sistema antioxidante es aquel sistema constituido por compuestos enzimáticos y no enzimáticos en la célula que intervienen en el proceso de regulación y detoxificación de EROS en la célula. El sistema antioxidante enzimático está constituido por un grupo de enzimas que intervienen en la eliminación de las EROS (Asada, 1992). Conformado por: catalasa (E.C.1.11.1.6, CAT), superóxido dismutasa (E C 1.15.1.1, SOD), peroxidasa (E C 1.11.1.7, POX), ascorbato peroxidasa (E C 1.11.1.11, APX), glutatión peroxidasa (E C 1.11.1.9, GPX), dehidroascorbato reductasa (E C 1.8.5.1, DHAR), guaiacol peroxidasa (E C 1.11.1.7, POD), tiorredoxina reductasa (E C 1.8.7.2, TRXs), etc. Siendo moléculas responsables de la eliminación de los radicales libres, los cuales se producen de manera natural, en los sitios de actividad energética celular (Benavides *et al.*, 2009; Saleem *et al.*, 2020).

El sistema antioxidante no enzimático está constituido por moléculas, como compuestos lipofílicos, hidrofílicos, alcaloides, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, ascorbato, ácido

ascórbico (AsA), y GSH, (Gill y Tuteja 2010; Hasanuzzaman *et al.*, 2012). Estos compuestos, regulan la producción y eliminación de EROS (Azevedo-Neto *et al.*, 2008, Munns y Tester 2008, Murillo *et al.*, 2007). En las plantas una reacción rápida de defensa es la explosión oxidativa, por medio de la cual se producen EROS, principalmente O_2^- y H_2O_2 las cuales son eliminadas posteriormente por los mecanismos de reacción enzimáticos o no enzimáticos (Gondim *et al.*, 2013; Gill y Tuteja 2010).

4.6.1 Catalasa

Las CAT son enzimas homotetraméricas que poseen hierro en su estructura molecular, con un peso molecular en el rango de 210-280 kD, se localizan principalmente en los peroxisomas, mitocondrias, glioxisomas y orgánulos relacionados donde se encuentran las enzimas generadoras de H_2O_2 , como la glicolato oxidasa (Willekens *et al.*, 1994, 1995, 1997). Existen tres formas principales o isoenzimas de catalasa: a) CAT1, la cual se localiza en gran parte de las hojas y es dependiente de la luz, además de que participa en la eliminación de H_2O_2 durante el proceso de fotorrespiración; b) CAT2, localizada en tejidos vasculares y la cual participa en la eliminación de H_2O_2 localizado en los glioxisomas, semillas y plantas jóvenes; c) CAT3 se puede localizar en células del mesófilo y pericarpios, es regulada por el ciclo circadiano, principalmente localizada en hojas y raíces (Chance y Maehly 1955; Havir y McHale 1989; Havir, 1992; Ni y Trelease, 1991; Scandalios *et al.*, 1997).

Entre sus funciones se encuentra la dismutación del H_2O_2 , en agua y oxígeno; la regulación del metabolismo de los organismos y su ambiente; además de la reducción de altas cantidades de H_2O_2 debido a su intervención directa con el H_2O_2 (Scandalios, 2005; Willekens *et al.*, 1995; Foyer y Noctor, 2005; Scandalios, 2005). De acuerdo con diversos autores, existe una relación directa entre la actividad catalasa y los factores presentes dependiendo de la intensidad, duración y tipo de estrés al que se le somete (Sharma *et al.*, 2012; Beers y Sizer, 1952).

4.6.2 Peroxidasa

La POX, es una proteína formada con un grupo hemomonomérico y es parte de una gran familia de peroxidasas de poca especificidad de sustrato, se localiza principalmente en los cloroplastos, vacuolas, peroxisomas, así como en la pared celular (Mittler, 2017). La POX cataliza la oxidación de diversos sustratos (fenoles, aminas aromáticas, e hidroquinonas) utiliza principalmente al peróxido de hidrógeno como cofactor (Mittler, 2017, Sgherri *et al.*, 2001). Está relacionada en la protección celular contra cualquier daño oxidativo causado por la presencia de altos niveles de H₂O₂ (Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002), interviene además en la respuesta de resistencia a patógeno, tolerancia a estrés abiótico, oxidación enzimática, la abscisión de flores, hojas, germinación y desarrollo, senescencia, dormancia, desarrollo de frutos, entre otros (Mehlhorn *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 2004). La clasificación de las peroxidasas se realiza a partir del sustrato que se utiliza como donador de electrones, debido a lo anterior podemos clasificar a las peroxidasas como: glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y la guaiacol peroxidasa (POX) (Mehlhorn *et al.*, 1996). De forma particular, la guaiacol peroxidasa (POX) funciona en diversas reacciones peroxidativas en la célula, removiendo el H₂O₂ (Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002). A pesar de que diversos autores reportan incrementos en la actividad peroxidasa frente a diversos estrés bióticos o abióticos (Gechev *et al.*, 2003) su función específica y su regulación permanecen aún en estudio (Mehlhorn *et al.*, 1996).

4.7 Osmolitos

Se denomina osmolito aquél compuesto que se disuelve dentro de la célula y juegan un papel vital en la regulación de la cantidad y el equilibrio hídrico de la misma, derivado de que un nivel elevado de azúcares solubles puede inducir una respuesta de tolerancia a la planta bajo estrés (Murakeözy *et al.*, 2003). Varios de los osmolitos identificados tienen una función osmoprotectora, entre los más conocidos encontramos a la sarcosina, taurina, glicerofosfocolina, mioinositol y prolina, entre otros. Su función osmoprotectora se basa en la desintoxicación de especies reactivas

de oxígeno, el equilibrio enzimático o proteico, la regulación osmótica y el mantenimiento de la integridad de la membrana (Verbruggen y Hermans 2008).

4.7.1. Prolina

La prolina es un aminoácido sintetizado a partir del ácido glutámico, que se desprende de las rutas metabólicas, que son las de glutamato y ornitina (Avendaño *et al.*, 2005; Ashraf y Foolad, 2007). Está localizada en cantidades basales dentro de las plantas de manera natural, estas cantidades incrementan en condiciones de estrés, ya que la prolina actúa en estas circunstancias como un agente osmótico el cual protege a la planta de la deshidratación, además de disminuir el potencial hídrico y contenido relativo del agua (Tajdoost *et al.*, 2007). Funciona como osmoregulador de acuerdo con lo descrito por Yoshida *et al.*, (1995). Además, Iyer y Caplan (1998), mencionan que la prolina actúa como estabilizador de membranas proteicas, e induce genes relacionados con el estrés osmótico. Brugière *et al.*, (1999) sugieren el uso de la prolina como fuente de carbono y nitrógeno para la rehidratación celular. La relación de la acumulación de prolina en respuesta de tolerancia se ha probado en diversos tipos de estrés como salinidad, déficit hídrico y temperaturas bajas (Jiménez-Bremont *et al.*, 2006, Avendaño *et al.*, 2005; Konstantinova *et al.*, 2002), actuando en conjunto con diversas moléculas señalizadoras como lo son el H₂O₂, y el AS (Foyer *et al.*, 1997; Foyer y Lelandais, 1993; Foyer y Noctor, 2005; Gong *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 1994).

Signorelli y Monzac, (2017) mencionan que la prolina acumulada debido a estrés osmótico es una de las primeras respuestas de defensa de la planta, por lo que la prolina se convierte en un marcador de estrés confiable. Por otro lado, Tamura *et al.*, (2003) indican que la acumulación de prolina induce cierta tolerancia al desequilibrio osmótico protegiendo a las membranas celulares de la deshidratación y regulando con ello diversos radicales libres presentes. De acuerdo con diversos estudios existe un incremento en la cantidad de prolina en diversos factores de estrés como sequías (Barnett y Naylor 1966; Singh *et al.*, 1973); estrés por temperaturas bajas (Köşkeröglü y Tuna, 2010; Kishor *et al.*, 1995). En la mayoría de las plantas sensibles a temperaturas bajas no se obtiene una tolerancia a dicho estrés, hasta que no existe una mayor

concentración de prolina dentro de la misma antes del estrés (Kushad y Yelenosky 1987; Xin y Li 1993).

4.8 Ácido salicílico

El ácido salicílico o ácido 2-hidroxibenzoico (AS; $C_7H_6O_3$) es un constituyente natural de origen fenólico de las plantas, además se puede considerar como un regulador del crecimiento, ya que posee funciones tales como, retrasar la senescencia de la planta, inducir la floración o tuberización, entre otros (Bourbouloux *et al.*, 1998, Raskin, 1992), además de tener la función de una molécula señalizadora debido a su función inductora de tolerancia al estrés biótico y abiótico (Raskin 1992; Mady, 2009; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). La síntesis del AS se puede llevar a cabo por la ruta de los fenil-propanoides a partir de la biosíntesis de la L-fenilalanina con ayuda de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL); o por la ruta del iscorismato donde la enzima isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL) son las encargadas de sintetizar el iscorismato para formar finalmente el AS (Janda y Ruelland, 2015; Kumar, 2014; Rangel *et al.*, 2010). La movilidad del AS se da principalmente dentro de la planta por medio del floema. Se difundirá a través de la membrana dependiendo del tamaño de la molécula, el número de donadores de hidrógeno, así como del área superficial disponible (Bonnemain *et al.*, 2013). En la vía de isocorismato (IC), el ácido corísmico (CA) se transforma en ácido isocorísmico en presencia de la enzima isocorismato sintasa (ICS), convirtiéndose finalmente en ácido salicílico en presencia de la enzima isocorismato piruvato liasa (IPL; Fragniere *et al.*, 2011).

También es posible que tenga acceso a otras células vecinas por medio de los plasmodesmos (simplásticamente) o de la pared celular (apoplásticamente). El AS endógeno puede entrar en las células vecinas, a través de los plasmodesmos (vía simplástica) o la pared celular (vía apoplástica) acumulándose en el citosol (Bonnemain *et al.*, 2013). Cualquier tipo de estrés estimula la biosíntesis de SA en el cloroplasto, que luego se transporta al citosol (Fragniere *et al.*, 2011; Maruri-López *et al.*, 2019), lo cual funciona como una molécula señal para la respuesta a estrés, el AS debe unirse a una célula blanco o a un receptor, los cuales pueden ser proteínas de unión con funciones señalizadoras (Yan y Dong, 2014; Vlot *et al.*, 2009; Kumar, 2014). Se ha reportado que el AS inhibe la actividad de la catalasa (CAT) así como del ascorbato peroxidasa (APX) citosólica,

incrementando los niveles de H₂O₂; contribuyendo así a la acumulación de H₂O₂ durante el estallido oxidativo, el cual se ve iniciado en presencia de diversos tipos de estrés bióticos o abióticos (Vlot *et al.*, 2009; Yang y Dong, 2014).

4.9 Ácido salicílico (AS) y su relación con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La acumulación de AS endógeno es promovida por efecto de un estrés por bajas temperaturas en algunas especies vegetales, permitiendo que éste actúe en la regulación de respuestas de tolerancia a dicho estrés (Miura y Tada, 2014). A pesar de que el AS puede ocasionar un estrés oxidativo, esto debido a la acumulación de H₂O₂ (Hara *et al.*, 2012), el AS induce estrés oxidativo en las plantas por la acumulación de H₂O₂, a pesar de ello un tratamiento con bajas concentraciones de AS puede tener una acción de aclimatación, lo que induce tolerancia a condiciones de estrés abióticos como resultado del incremento de la capacidad antioxidante (Janda *et al.*, 2003).

Lo anterior se debe a que los tratamientos con AS inducen un aumento en la concentración de H₂O₂ lo que hace que se cree una señalización de la expresión génica (Janda *et al.*, 2015) Esta inducción de tolerancia a frío por AS está asociada con el aumento del sistema antioxidante como se ha demostrado en especies como papa (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado 2006), trigo (Yordanova y Popova 2007; Mutlu *et al.*, 2013), maíz (Fryer *et al.*, 1998; Janda *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2015), plantas de tomate (Salwa *et al.*, 2015), arroz (Kang y Saltveit 2002), plántulas de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) (Luo *et al.*, 2014), aceituna (Hashempour *et al.*, 2014) y hojas de fresa (Zhang *et al.*, 2008).

Por su parte el H₂O₂ es un intermediario de las respuestas de tolerancia inducidas por AS, ya que señala la inducción de tolerancia a estrés al frío. La aplicación de H₂O₂ de forma exógena induce tolerancia a temperaturas bajas mediante cambios en el sistema antioxidante en diversas plantas, como se ha reportado en microplantas de *Solanum tuberosum* L. (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006), plántulas de maíz (Ahmad *et al.*, 2015) y *Brassica juncea* L. (Kumar *et al.*, 2010). El tratamiento con ácido salicílico (AS) en plántulas de maíz indujo un aumento en los niveles de H₂O₂ endógeno, desencadenando una cascada de señalización de enzimas antioxidantes incrementando los niveles de tolerancia a diversos factores de estrés como

el frío (Janda *et al.*, 1999). La aplicación exógena de AS en plántulas de trigo redujo los daños de la membrana celular, esto después de someterlas al estrés por congelamiento; resultando en el incremento de los niveles endógenos de H₂O₂ y ABA desencadenando respuestas de tolerancia a estrés (Wang *et al.*, 2018).

4.10 Efecto del ácido salicílico y peróxido de hidrógeno a temperaturas bajas

En diferentes investigaciones se ha reportado que el AS y el H₂O₂; participan en la inducción de tolerancia al estrés generado por diversos factores en plantas, tales como trigo, tomate, maíz y arroz (Gunes *et al.*, 2007, Bezrukova *et al.*, 2001), y se relaciona con el aumento o decremento de la actividad enzimática antioxidante de CAT, APX y SOD (Gunes *et al.*, 2007). Teniendo principalmente una acción inhibitoria de la actividad de CAT y APX, por lo que la concentración de H₂O₂ incrementa a fin de intensificar y dispersar señales para inducir respuestas de adaptación en las plantas (Rao *et al.*, 1997). Así el H₂O₂ y el AS se ven involucrados en diversas respuestas de aclimatación y tolerancia a temperaturas bajas, el H₂O₂ formado durante un estrés abiótico es parte de la señalización en cascada la cual conlleva a cambios fisiológicos.

Como consecuencia de la función señalizadora del AS, por lo cual es utilizado como tratamiento en el cultivo de papa para inducir tolerancia a diversos tipos de estrés a los que el cultivo se ve sometido (López-Delgado *et al.*, 1998; Dat *et al.*, 1998; López-Delgado *et al.*, 2004; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado 2006).

Algunos efectos del AS bajo estrés por frío, se ven reflejados directamente en: la germinación de semillas, debido al retraso de la germinación y crecimiento, al presentar una inhibición de la longitud promedio del coleoptilo y la radícula (Sharifi, 2010). El crecimiento y desarrollo de la planta se puede ver afectado por el frío el cual reduce la acumulación de materia seca en las plantas, también puede causar alteraciones de varios procesos citológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares como la fotosíntesis, la permeabilidad de la membrana plasmática, el estado del agua, el equilibrio osmótico, entre otros procesos (Janda *et al.*, 2015). A nivel molecular, el estrés por frío afecta la síntesis de proteínas y expresiones génicas y favorece el desarrollo de estructuras secundarias en el ARN (Rajkowitsch *et al.*, 2007; Ruelland *et al.*, 2009). El H₂O₂ tiene

un papel crucial en la aclimatación y la inducción de tolerancia cruzada (Neill *et al.*, 2002). La producción endógena de H₂O₂ puede aumentar la tolerancia del estrés por frío (Prasad *et al.*, 1994).

La exposición a temperaturas bajas o ultrabajas disminuyen la actividad de algunas enzimas con función reguladora, impidiendo la reducción adecuada de los productos generados por la fotorreducción del oxígeno así como una menor actividad de las enzimas defensivas a temperaturas frías (Kang *et al.*, 2003; Anderson, 2002; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006). El AS y el H₂O₂ se involucran en diversas respuestas de aclimatación (López-Delgado *et al.*, 2018), así como tolerancia a temperaturas ultrabajas en diversas especies (Bernard *et al.*, 2000; Pathirana *et al.*, 2016; Benson, 2008).

Las concentraciones bajas de AS pueden aumentar la capacidad antioxidante y la tolerancia al estrés abiótico, pero al ser una molécula alelopática las concentraciones altas de AS pueden causar la muerte celular o la susceptibilidad al estrés abiótico (Hara *et al.*, 2012). El AS es una molécula de señalización importante en las plantas, ya que de acuerdo con la literatura presenta diversos efectos al ser aplicada, como lo son el incremento de la tolerancia al enfriamiento y la promoción de la emergencia sincrónica del maíz mediante la activación de antioxidantes (Farooq *et al.*, 2009); además la aplicación de AS induce tolerancia al frío en maíz, pepino y arroz (Kang y Saltveit, 2002). Las papas tratadas con AS presentan inducción de tolerancia a la congelación (Mora-Herrera *et al.*, 2005). La aplicación de AS en banano induce tolerancia al enfriamiento (Kang *et al.*, 2003). Miura y Tada (2014), sugirieron que la señalización de SA puede estar interrelacionada con la inducción de la tolerancia al frío y que ésta puede ser específica de la especie y depender de la concentración y periodo de aplicación. Quan *et al.*, (2008), concluyeron que el H₂O₂ está implicado en la síntesis de AS, donde la conversión del ácido benzoico en AS se cataliza por el H₂O₂ a través de la activación del ácido benzoico-2-hidroxilasa y que cualquiera de las aplicaciones de H₂O₂ o AS se induce mutuamente.

4.11 Uso de AS y H₂O₂ en procesos criogénicos

Los métodos criogénicos imponen una serie de condiciones de estrés en el material vegetal, que podrían inducir modificaciones en los cultivos crioconservados y en las nuevas plantas

regeneradas (Engelmann, 2000). Las investigaciones para las especies con semillas recalcitrantes se encuentran aún en una fase preliminar (Engelmann, 2000), debido a que la supervivencia es extremadamente variable, y la regeneración frecuentemente está restringida a callos o al desarrollo incompleto de plántulas y generalmente el número de accesiones evaluadas por especie es muy bajo (Engelmann, 2000).

La adición de antioxidantes a los crioprotectores o el medio de recuperación es esencial para obtener un incremento en la regeneración (Baek and Skinner, 2012; Uchendu *et al.*, 2010a; b). La formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) durante procesos criogénicos puede ocurrir en los pasos involucrados en el proceso (Kazmarczyk *et al.*, 2012) y se ha demostrado que la adición de antioxidantes exógenos durante la crioconservación resulta en una mayor supervivencia en algunos casos (Uchendu *et al.*, 2010a; Wang y Deng, 2004). El AS induce un incremento de enzimas antioxidantes durante periodos de pre-aclimatación a bajas temperaturas en plantas tratadas (Sasheva *et al.*, 2010; López-Delgado *et al.*, 2018). Mora-Herrera y López-Delgado (2006), encontraron que el AS induce tolerancia a temperaturas bajas en papa.

La aplicación exógena de H₂O₂ a concentraciones bajas realiza una función señalizadora para la inducción de respuestas de defensa en plantas contra el estrés oxidativo desencadenando mecanismo de resistencia (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016; López-Delgado *et al.*, 2018; Mora-Herrera *et al.*, 2005). A pesar de ello el uso de H₂O₂ en procesos criogénicos aun es un campo un explorado.

5. JUSTIFICACIÓN

Todas las fases que constituyen a la criogenia presentan la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno, causando daños o muerte celular influyendo en la disminución de porcentajes de supervivencia y regeneración en varias especies (Chen *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las enzimas antioxidantes como la catalasa, la peroxidasa y la concentración de peróxido de hidrógeno, junto con osmolitos como la prolina, están asociados a la tolerancia al estrés generado en procesos criogénicos (Lynch *et al.*, 2011; Danova *et al.*, 2012; Vianna *et al.*, 2019). El uso de moléculas cuya función esté relacionada con cambios en el sistema antioxidante y con la producción de especies reactivas de oxígeno, se ha utilizado como pretratamientos en procesos criogénicos (Cuenda *et al.*, 2010a; b; Pathirana *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2011). El ácido salicílico (AS) ha sido utilizado como inductor de tolerancia a temperaturas ultrabajas en procesos criogénicos en plantas de *Solanum tuberosum* L. para aumentar la supervivencia, la generación de plantas libres de virus y aumentar variables relacionadas con la regeneración (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019; Ayala Hernández *et al.*, 2019). Se ha reportado que la interacción entre AS y H₂O₂ puede conducir a una señal de amplificación y desencadenar respuestas de señalización a varios tipos de estrés en papa (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016; López-Delgado *et al.*, 2004; 2018; Mora-Herrera *et al.*, 2005). El uso de pretratamientos de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ha sido utilizado para inducir tolerancia al estrés a temperaturas bajas en plantas de *Solanum tuberosum* L. (Mora-Herrera *et al.*, 2005; López-Delgado *et al.*, 2018). Aunque se ha reportado que el AS induce tolerancia a crioterapia, no existen reportes que establezcan la asociación directa con la supervivencia, por lo cual se justifica estudiar el incremento de la supervivencia y la posible asociación en la actividad enzimática de CAT, POX al igual que en el contenido de H₂O₂ y prolina. El H₂O₂ no ha sido aplicado en procesos criogénicos con la finalidad de investigar su función de señalización, por lo tanto, se justifica el estudio de pretratamientos H₂O₂, en la supervivencia de explantes de *Solanum tuberosum* L. y la relación CAT, POX, contenido de H₂O₂ y prolina, en la inducción de tolerancia al estrés generado por los procesos criogénicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Todos los experimentos se realizaron con vitroplantas de los clones 981818 y 06-27 provenientes del banco de germoplasma *in vitro* del laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Metepec, Estado de México, México.

6.2 Condiciones de cultivo

Todos los experimentos se iniciaron a partir de esquejes nodales (con una yema axilar y hoja). Los esquejes fueron sembrados y subcultivados cada 30 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y micropropagados de acuerdo al método descrito por Espinoza *et al.* (1986), con la finalidad de mantener e incrementar el material biológico. El cultivo *in vitro* se mantuvo con un fotoperiodo de 16 horas de luz, con una temperatura promedio de 20 ± 1 °C y una radiación fotosintéticamente activa de $35 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ y 400-700 nm.

6.3 Medio de cultivo para propagación

El medio básico se preparó con 100 mL de sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa, glicina, tiamina, mio-inositol, ácido nicotínico, piridoxina, y ácido giberélico (Anexo A). El pH del medio de cultivo se ajustó con hidróxido de potasio (KOH, 1 N) hasta un pH final de 5.7, seguido de la adición de fitagel disuelto mediante calor.

El medio caliente se colocó en un volumen de 20 mL en frascos de vidrio de 70 mm de altura y diámetro de 45 mm con tapa de plástico transparente. También se añadieron 2 mL de medio líquido sin gelificante y frío en tubos de 100 mm de altura y 10 mm de diámetro; los tubos contenían un puente de papel de 60 mm x 9 mm doblado en forma de M, con tapa de aluminio de 40 mm x 40 mm. El medio de cultivo se esterilizó durante 18 min a 15 lb a 120 °C. Todos los materiales utilizados en la micropropagación como pinzas, bisturís, matraz y cajas petri se esterilizaron durante 18 min a 15 lb a 120 °C.

6.4 Solución madre de Ácido Salicílico

La solución de ácido salicílico (AS) se preparó pesando 5 mg AS, disolviéndose con 40 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) aforando con agua destilada hasta 10 mL para obtener una concentración final de 3.6×10^{-3} M. La solución madre se utilizó para la preparación de medios que contenían AS, estos medios se prepararon de la misma manera durante toda la investigación.

6.5 Preparación de soluciones de Peróxido de hidrógeno para incubación

Se prepararon 20 mL de solución individual a las siguientes concentraciones: 0, 1, 2.5, 5 y 10 mM en fresco para cada una de las incubaciones, empleando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % y aforando hasta el volumen indicado.

6.6 Incubaciones en Ácido Salicílico

La concentración seleccionada para esta investigación se basó en reportes de la literatura donde la incubación de AS 10^{-6} induce tolerancia a frío (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006), congelamiento (López-Delgado *et al.*, 2018) y finalmente en criogenia (Ruiz-Sáenz *et al.*, 2019; Ayala-Hernández *et al.*, 2019). Demostrando ser la concentración con una posible actividad biológica, al inducir cambios enzimáticos, contenido de peróxido de hidrógeno y aumentar la supervivencia en frío (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006; López-Delgado *et al.*, 2018)

Se utilizó medio de propagación MS como base y se adicionó AS proveniente de la solución madre hasta alcanzar la concentración final de 10^{-6} M. Se colocó un volumen de 20 mL del medio MS con AS en frascos de vidrio de 70 mm de altura y diámetro de 45 mm con tapa de plástico. El medio de cultivo se esterilizó durante 18 min a 15 lb y 120 °C.

Esquejes nodales de vitroplantas se diseccionaron (5-6 mm longitud) en condiciones estériles. Se sembraron 8 esquejes nodales sin hoja por frasco en las concentraciones 0 (control) y 10^{-6} M de AS. El cultivo *in vitro* se mantuvo durante 4 semanas en condiciones de cultivo.

6.7 Incubaciones en Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Esquejes nodales sin hoja provenientes de vitroplantas se diseccionaron (5-6 mm de longitud) para ser incubados en H₂O₂. Los esquejes se incubaron en 20 mL de solución en concentraciones de 0, 1, 2.5, 5 y 10 mM de H₂O₂ durante 1h en cajas petri, en condiciones de oscuridad utilizando papel aluminio. Transcurrido el tiempo, los explantes se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se sembraron inmediatamente en frascos con medio de propagación MS. El cultivo *in vitro* se mantuvo durante 4 semanas en condiciones estandar de cultivo.

La selección de concentraciones se realizó con base en los datos obtenidos en los parámetros de crecimiento, donde se encontró que la aplicación exógena de H₂O₂ en estas concentraciones no inducía muerte en los clones 981818, pero sí inducía reducción en algunos parámetros. Las concentraciones seleccionadas para este estudio fueron las de 1mM al considerarse la concentración más baja para probarse y 5mM donde se encontró reducción de algunos parámetros; una reducción significativa se observó en plantas provenientes de la concentración 10 mM de H₂O₂ en comparación al control. Aunado a lo anterior, la incubación en las concentraciones de 1 y 5 mM han demostrado inducir tolerancia a estrés térmico (Aguilar-Camacho *et al.*, 2015, Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado 2006; López-Delgado *et al.*, 1998; 2018).

6.8 Fases experimentales

Fase Cero (F0): Evaluación de los efectos de AS y H₂O₂ en parámetros de crecimiento a los 30 días de desarrollo en clones de papa.

Esta fase consistió en la evaluación del efecto de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en parámetros de crecimiento (altura de la planta, longitud de raíz, peso fresco, número de entrenudos) en plantas de los clones 981818 y 06-27 a la edad de 30 días.

Fase Uno (FI): Evaluación de efectos de incubaciones de SA Y H₂O₂ en actividad antioxidantes CAT POX, contenido de H₂O₂, contenido prolina y potencial hídrico antes de la criogenia de los clones de papa.

Fase dos (FII): Evaluación de efectos de SA y H₂O₂ en los parámetros considerados después de criogenia de los clones de papa.

6.9 Método de D-crioplaca en FII

Disección

Yemas axilares por tratamiento fueron diseccionadas (1-2 mm de longitud) y transferidas a medio MS basal (0.3 M sacarosa) a 21°C durante 3 días. Transcurridos los 3 días del subcultivo se realizó el método de criogenia denominado Deshidratación-Crioplaca de acuerdo con el protocolo de Yamamoto *et al.*, (2015) modificado por Niino y Arizaga *et al.*, (2015).

Método de Deshidratación-crioplaca

Crioplacas de aluminio de un tamaño de 7 x 37 x 0.05 mm y 12 pozos ovalados fueron utilizadas en esta metodología.

1. Se depositó por pozo una gota de 2 µL de una solución Alginato de sodio (3% p/v alginato de sodio y 0.4 M sacarosa en solución basal de medio MS, Anexo A y B)

2. Yemas diseccionadas y provenientes de cada tratamiento fueron transferidas a cada pozo y cubiertas nuevamente con 2 µL de solución de alginato de sodio. Una hoja de papel BEMCOT esterilizada (7 x 30 mm) fue colocada sobre la crioplaca, seguido de la adición de 400 µL de una solución de cloruro de calcio (0.1 M cloruro de calcio y 0.4 M sacarosa en solución basal de medio MS, Anexo B) hasta cubrir completamente. La polimerización del alginato de sodio se completó

al término de 15 min, bajo condiciones de temperatura ambiental. El exceso de solución de cloruro de calcio fue removido de la crioplaca.

3. La crioplaca con las yemas y el papel BEMCOT adherido fueron transferidas a una solución de carga (SC: 2.0 M glicerol y 1.0 M sacarosa en solución basal de medio MS, Anexo B) durante 45min.

4. La crioplaca fue removida de la SC y se prosiguió a la deshidratación en cajas petri que contenían 35 g de sílica gel seco. La crioplaca con las yemas y el papel BEMCOT adherido se mantuvieron durante 90 min en las condiciones antes mencionadas.

5. Posterior a la deshidratación, la crioplaca se transfirió a criotubos (2 mL) montados en una criocaña y llenos con nitrógeno líquido, manteniéndose en un termo hermético con nitrógeno líquido, durante 60 min.

6. Para la regeneración, se recuperaron los criotubos del nitrógeno. Las crioplacas se sumergieron en 2 mL de una solución de sacarosa (1.0 M sacarosa con solución basal de medio MS, Anexo B) durante 15 min a temperatura ambiente.

7. El papel adherido con las yemas se retiró de la crioplaca y se colocó en una caja petri con 20 mL de medio MS sólido. Las yemas se removieron del alginato y se colocaron en medio sólido fresco.

8. Para la regeneración se colocaron las yemas en cajas petri en oscuridad por 24 h para evitar una fotoxidación.

6.10 Potencial hídrico en la deshidratación en criogenia

Material vegetal

Treinta y seis yemas por muestra, para cada tratamiento de microplantas de *Solanum tuberosum* L. provenientes de los pretratamientos AS y H₂O₂ fueron sometidas a criogenia, utilizando el método de D-crioplaca (Yamamoto *et al.*, 2015). La determinación de potencial hídrico (Ψ_A) se evaluó en la etapa de deshidratación, utilizando cámaras psicrométricas (Wescor, C-52) conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescor, HR-33T) (Boyer *et al.*, 1985).

Calibración del equipo

Se determinó el coeficiente de enfriamiento de cada cámara, mediante el uso de soluciones de cloruro de sodio de 0.1 - 0.6 M (Anexo G). Un disco de papel filtro se embebió en cada una de las soluciones y se colocó dentro de cámaras psicrométricas C-52 (Wescor Inc. Logan, UT, USA) y se incubó durante 30min. Una vez transcurrido el tiempo, cada cámara se conectó a un microvoltímetro de punto de rocío (HR-33T, Wescor Inc. Logan, UT, USA), se ajustó su coeficiente de enfriamiento, se ajustó a cero y se determinó el potencial por el método de punto de rocío. Repitiendo la operación con cada cámara psicrométrica.

La determinación del potencial de agua en las muestras de tejido se llevó a cabo colocando 36 yemas encapsuladas en alginato de sodio, correspondientes a cada uno de los pretratamientos en el contenedor de muestra de la cámara, se introdujo dentro de la cámara psicrométrica donde se mantuvo en incubación durante 3h. Transcurrido el tiempo se determinó el potencial de agua siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en cada una de las cámaras psicrométricas.

6.11 Supervivencia

Se determinó la supervivencia a los 3 días posteriores al descongelamiento y se confirmó a los 15 días posteriores, se consideró el número de plantas vivas a aquellas que no presentaban oxidación de los tejidos, pérdida de turgencia, cambio de color (blanco) y que retomaron su crecimiento normal con base en observaciones visuales.

6.12 Evaluaciones enzimáticas y de contenidos (CAT, POX, H₂O₂ y Prolina)

Para todas las determinaciones enzimáticas de la CAT, la POX y los contenidos de H₂O₂ y prolina, previamente se realizó la disección del material vegetal como se menciona a continuación para la Fase uno (FI). Para la evaluación de tratamientos antes de criogenia, yemas axilares y apicales provenientes de pretratamientos de ácido salicílico o peróxido de hidrógeno se diseccionaron en un tamaño de 1-2 mm para su subcultivo, colocándose 50 unidades por muestra sobre un papel filtro (4.5 x 3.5 x 1 cm) en una caja petri con 20 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) durante 3 días, de acuerdo con lo marcado en el protocolo de Yamamoto *et al.*, (2015) antes de la exposición a agentes osmoprotectores. Para la fase dos (FII) el material vegetal se diseccionó de igual manera que en la FI, se sometió a criogenia y se transfirieron a medio MS para realizarse las mediciones a las 12 y 72 h de regeneración.

6.13 Determinaciones enzimáticas de CAT y POX

Extracción de proteína total para lectura de enzimas

Cien miligramos de material vegetal por muestra se maceraron en frío con 400 µL de solución amortiguadora de potasio 50 mM, pH 7.2; dithiotheitol (DTT) 5 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y Polyvinylpirrolidona (PVP al 2% para CAT y 1% para POX. Anexos C y D). La muestra se centrifugó a 10 000 g, 15 min a 4 °C. La fase líquida final se colocó en un tubo eppendorf limpio para la lectura de muestras.

6.14 Catalasa

La cuantificación enzimática de la catalasa (E C 1.11.1.6) se realizó de acuerdo con el método de Aebi (1984) mediante espectrofotometría. La actividad enzimática de la catalasa se cuantificó utilizando como blanco 2.98 mL de una solución de fosfato de potasio y sodio 50 mM (Anexo C), pH 7 y 20 µL del extracto de proteína, para tener un volumen final de 3 mL. Para la lectura se colocó 1.98 mL de la solución amortiguadora y 20 µL del extracto de proteína y 1 mL

de solución de H₂O₂ 30 mM a 25 – 28 °C. Se midió el consumo de H₂O₂ como el decremento de absorbancia a $\lambda = 240$ nm en intervalos de 20 s durante 3 min. Para obtener la actividad de la catalasa se usó el coeficiente de extinción para H₂O₂ de $\epsilon 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, los resultados se expresaron en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$.

6.15 Peroxidasa

La cuantificación enzimática de la peroxidasa (E C 1.11.1.7) se realizó de acuerdo con el método descrito por Srivastava y Dwivedi (1998) mediante espectrofotometría. La actividad enzimática de la peroxidasa se cuantificó utilizando como blanco una mezcla de reacción que contenía: solución de fosfato de potasio 50 mM (Anexo D) pH 7, 3.33 mM de guayacol, 4 mM de H₂O₂. Para la lectura de muestras se colocó 2.98 mL de la mezcla de reacción y 20 μL del extracto de proteína a 25 – 28 °C. Se midió el incremento de la absorbancia con base en la oxidación del sustrato (guayacol) a $\lambda \approx 470$ nm, en intervalos de 30 s durante 3 min. La actividad específica se determinó midiendo la formación de una mol de tetraguayacol, utilizando un coeficiente de extinción molar de $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y los resultados se expresaron como $\mu\text{mol guayacol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$.

6.16 Determinación de contenido de peróxido de hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno se determinó de acuerdo con el método descrito por Sergiev *et al.*, (1997). Se pesó 0.15 g de tejido vegetal proveniente de cada uno de los tratamientos y se maceró en frío con 1.8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.1% (p/v), el extracto se centrifugó a 12,000 g, 15 min a 4 °C. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf limpio evitando resuspender sedimentos del fondo.

El blanco consistió en una mezcla de 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM pH 7 y 1 mL de KI 1 M. Para la muestra se colocó 0.5 mL del sobrenadante adicionándole 0.5 mL de buffer de fosfato de potasio 10 mM pH 7 y se le añadió 1 mL de una solución de KI 1 M, la mezcla se incubó en oscuridad y 4 °C durante 60 min. Para la lectura de las

muestras se homogeneizó la muestra durante 10 s, para su posterior lectura a $\lambda = 390$ nm. Los valores finales se calcularon con base en la lectura de una curva de referencia (ANEXO F).

6.17 Prolina

El contenido de prolina se determinó de acuerdo con el método descrito por Bates *et al.*, (1973). Se pesaron 100 mg de tejido vegetal proveniente de cada tratamiento, se maceraron con 2.5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 %. El extracto se centrifugó a 14,000 rpm, 5 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo falcón limpio.

Dos mL del sobrenadante de muestra vegetal se colocaron en un tubo de vidrio, se adicionó 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial, el blanco consistió en una mezcla de: 2 mL de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninhidrina acida y 2 mL de ácido acético glacial. Cada tubo con la mezcla se agitó en vortex por 20 s hasta obtener una emulsión. Los tubos se colocaron en baño maría a 97 °C, 45 min. Se transfirieron los tubos inmediatamente a agua con hielo durante 5 min. A cada tubo se le adicionó 4 mL de tolueno y se agitó con vortex durante 10 s. Los tubos se colocaron en una gradilla hasta observarse la separación de las fases, la fase superior se recuperó y colocó en un tubo limpio para su posterior lectura en espectrofotómetro a una longitud de $\lambda = 520$ nm. Para determinar el contenido se realizó mediante la preparación de una curva estándar como referencia para la cuantificación de contenido de prolina en muestras vegetales (ANEXO E).

6.18 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, con unidades experimentales iguales por tratamiento en cada repetición, con 3 repeticiones. Las mediciones enzimáticas se realizaron por triplicado muestreando 3 individuos para cada repetición. Las variables continuas se analizaron por medio de la prueba ANDEVA ($P \leq 0.05$), en algunos casos los promedios de los tratamientos

se analizaron con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), los datos categóricos fueron analizados con la prueba de χ^2 mediante el programa Statgraphics plus 5.0.

7. RESULTADOS

7.1 Altura de la vitroplanta, número de entrenudos, longitud de la raíz y peso fresco en respuesta a la aplicación de ácido salicílico

Después de 30 días de crecimiento, las vitroplantas incubadas en el AS de los clones 981818 y 06-27 disminuyeron su altura en un 58.6 % y un 42 % respectivamente, en contraste con sus controles (Fig. 1).

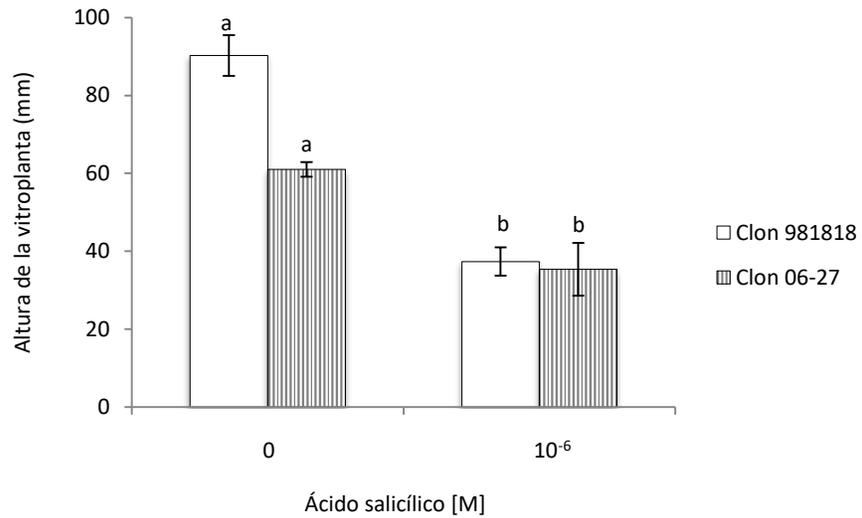


Figura 1. Efecto de la presencia del ácido salicílico en la altura de la vitroplanta, en 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

Las vitroplantas del clon 981818 incubadas en el AS mostraron una disminución significativa de la longitud de la raíz del 64 % y las vitroplantas del clon 06-27 no mostraron diferencias significativas con respecto a sus controles a los 30 días (Fig. 2).

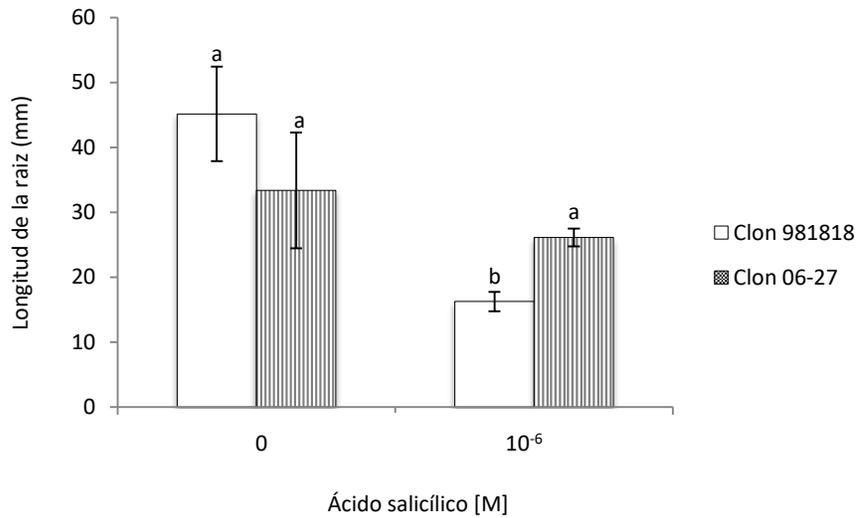


Figura 2. Efecto de la presencia del ácido salicílico en la longitud de raíz de las vitroplantas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Las vitroplantas del clon 981818 incubadas en el AS mostraron una disminución significativa en el peso fresco del 53.3 %, mientras que en vitroplantas del clon 06-27 no hubo diferencias significativas en el peso fresco, en contraste con sus respectivos controles a los 30 días (Fig. 3).

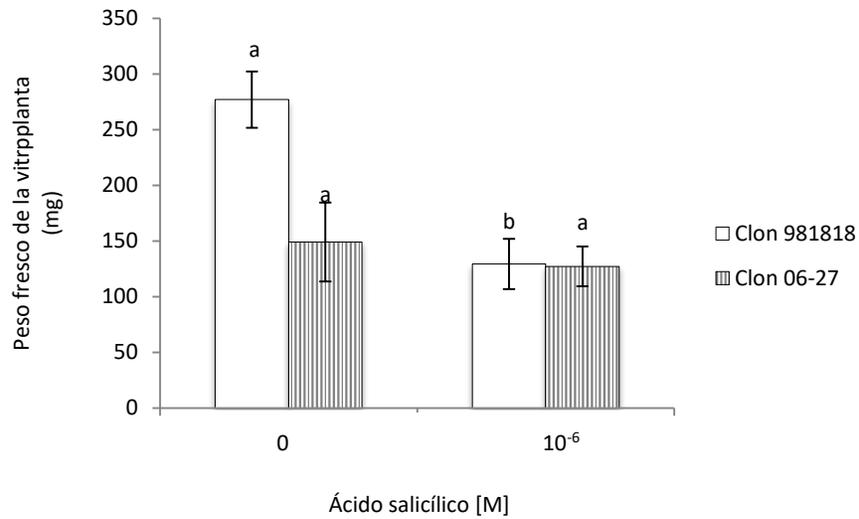


Figura 3. Efecto de la presencia del ácido salicílico en el peso fresco de las vitroplantas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, α 0.05).

Las vitroplantas incubadas de AS del clon 981818 mostraron diferencias significativas en el número de entrenudos del 41.4 % respecto al control mientras que las vitroplantas del clon 06-27 no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 4).

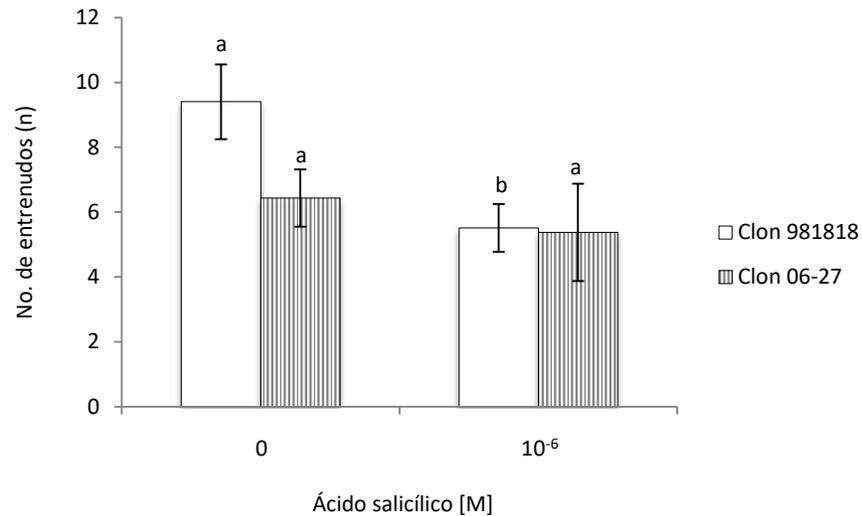


Figura 4. Efecto de la presencia de ácido salicílico en el número de entrenudos de las vitroplantas en 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Las barras son el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, α 0.05).

7.2 Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina antes del proceso de criogenia en respuesta a pretratamiento de ácido salicílico

7.2.1 Actividad de la catalasa

Yemas provenientes de vitroplantas pretratadas con AS del clon 981818 y 06-27 mostraron una disminución en la actividad de la catalasa del 28.3 % y 26.2 % respectivamente, ambos en contraste con sus controles (Fig. 5).

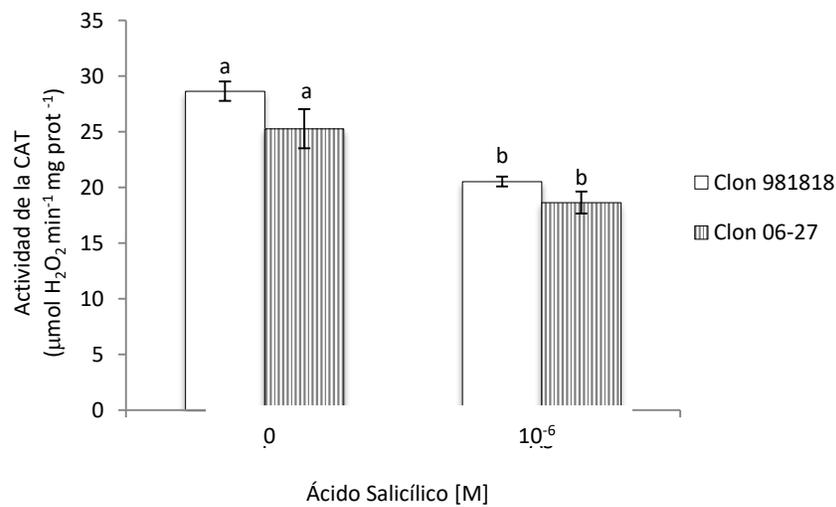


Figura 5. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la catalasa (CAT), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$)

7.2.2 Actividad de la peroxidasa

Yemas provenientes de viplantas pretratadas con AS mostraron una disminución en el clon 981818 del 22.2 %, mientras que las yemas provenientes del clon 06-27 mostraron un incremento del 78 % respecto a sus controles en la actividad de la peroxidasa (Fig. 6).

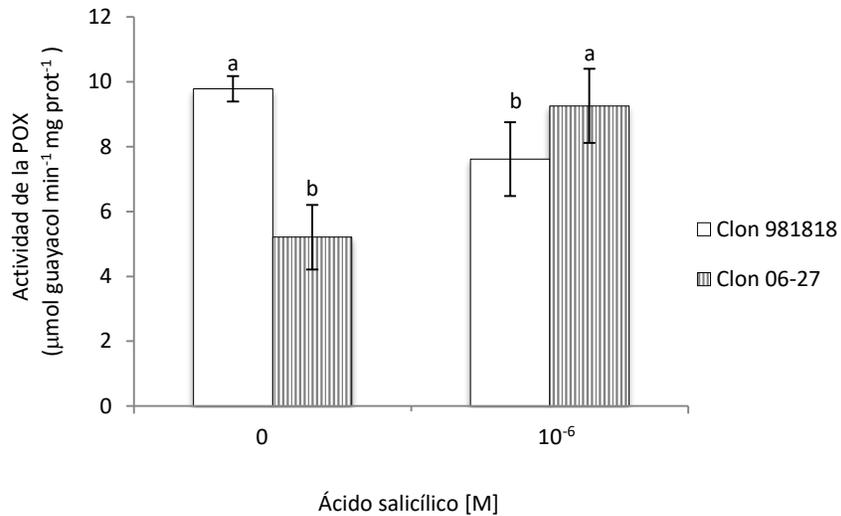


Figura 6. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la peroxidasa (POX), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.2.3 Contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Las yemas provenientes de las vitroplantas pretratadas con AS del clon 981818 y 06-27 mostraron un incremento del 60 % y 41.4 % respectivamente, en el contenido de peróxido de hidrógeno en contraste con el control (Fig. 7).

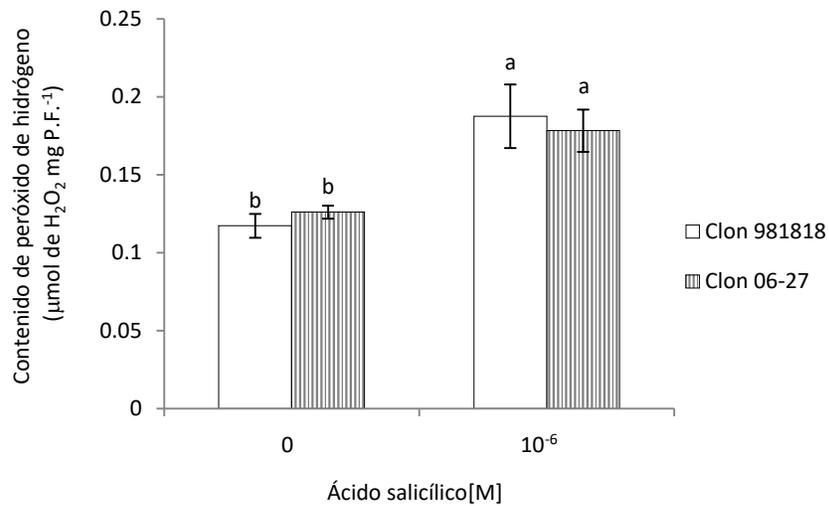


Figura 7. Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± el E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.2.4 Contenido de prolina

Yemas provenientes de vitroplantas pretratadas con AS del clon 981818 mostraron un incremento de 2.3 veces en el contenido de prolina, a su vez las yemas pretratadas con AS del clon 06-27 mostraron un incremento del 48 % del contenido de prolina en ambos clones respecto a sus controles (Fig. 8).

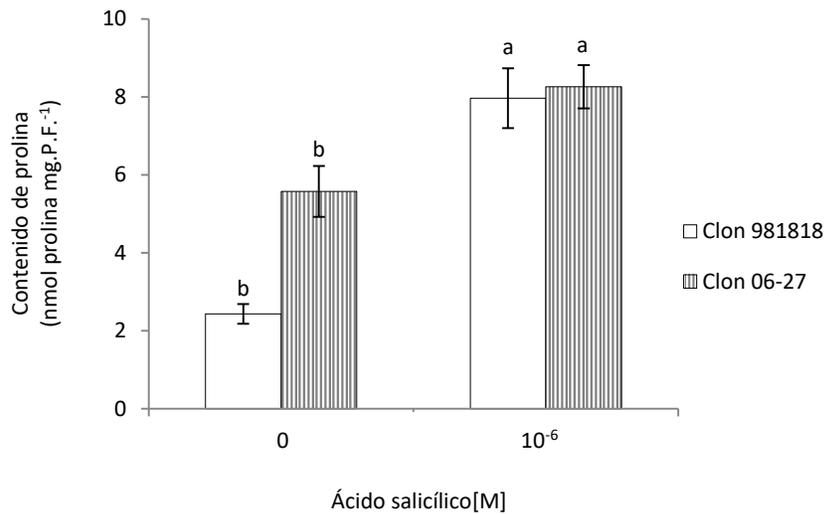


Figura 8. Efecto del ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$)

7.3 Potencial hídrico en yemas de dos clones pretratados con ácido salicílico en la etapa de deshidratación en el método criogénico D-crioplaca

Las yemas del clon 981818 y 06-27 provenientes de pretratamientos de AS mostraron un incremento significativo de 24.5 % y 12.4 % respectivamente; en comparación con los valores de potencial hídrico de los controles (Fig. 9).

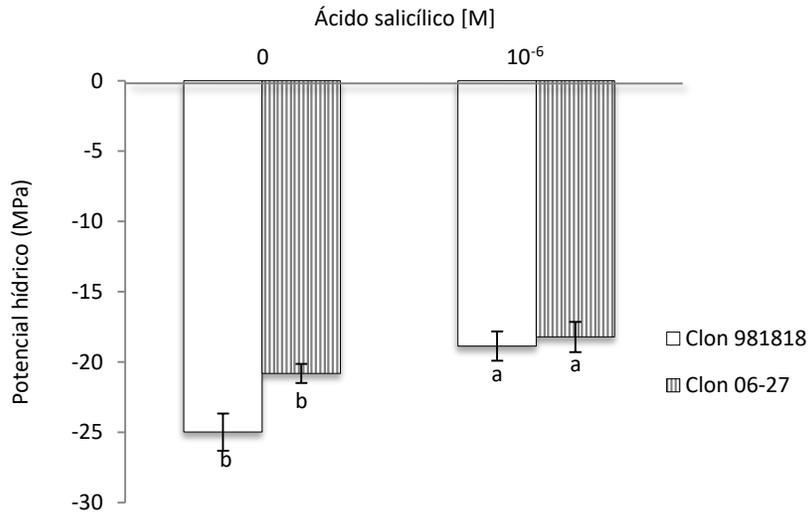


Figura 9. Efecto del ácido salicílico en el potencial hídrico (Ψ_A), después de la deshidratación durante criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de microplantas incubadas en AS por 30 días, diseccionadas y subcultivadas a medio MS por 3 días. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.4 Supervivencia posterior a criogenia de dos clones pretratados con ácido salicílico

Las yemas pretratadas en AS y sometidas a criogenia del clon 981818 mostraron un incremento en la supervivencia del 200 % y 96.2 % en las yemas pretratadas de AS del clon 06-27 ambos respecto a su control (Fig. 10).

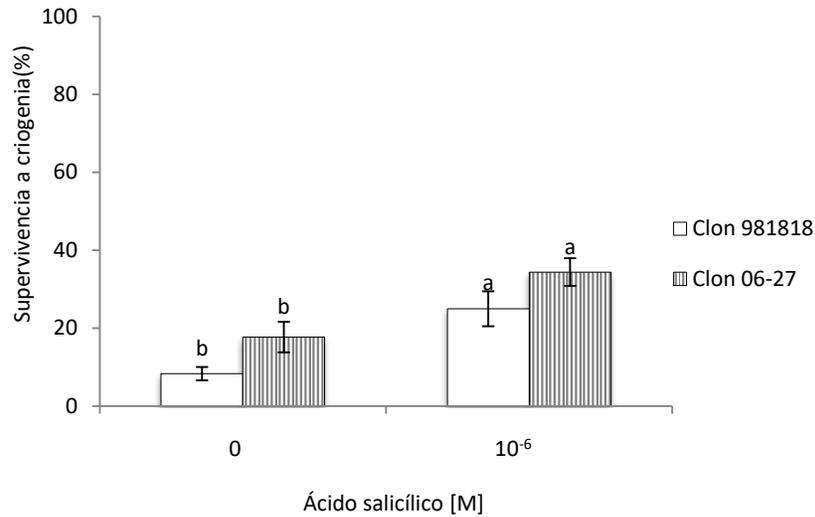


Figura 10. Efecto del ácido salicílico en la supervivencia después de criogenia, en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 72 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.5 Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina a las 12 y 72h de regeneración después de criogenia en yemas de dos clones pretratados con ácido salicílico

7.5.1 Actividad de la catalasa

Las yemas pretratadas en AS del clon 981818 mostraron una disminución del 57 %, así como las yemas pretratadas de AS del clon 06-27 mostraron un incremento del 57 % en la actividad de la catalasa, a las 12 h en la etapa de regeneración después de ser sometidas a criogenia ambos respecto al control (Fig. 11).

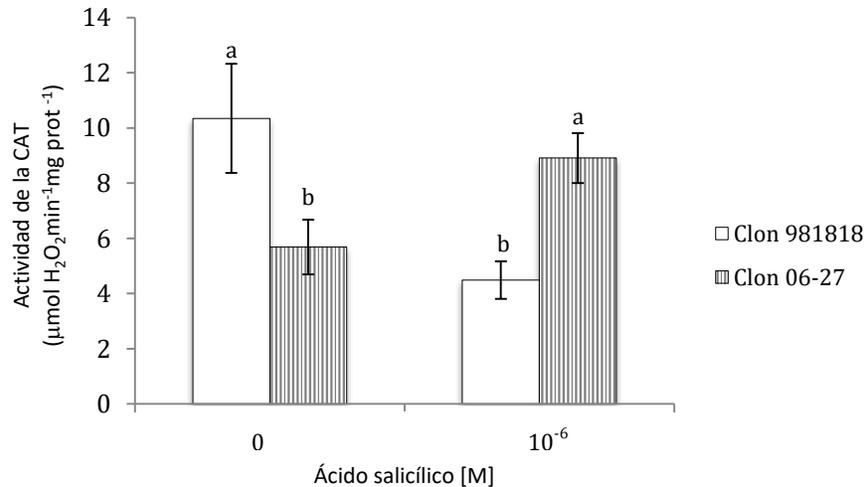


Figura 11. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la catalasa (CAT) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

A las 72 h de regeneración, las yemas de *Solanum tuberosum* pretratadas con AS sometidas a criogenia, mostraron un incremento en la actividad de la catalasa en el clon 981818 de 92 % y del 86 % en contraste con su respectivo control (Fig. 12).

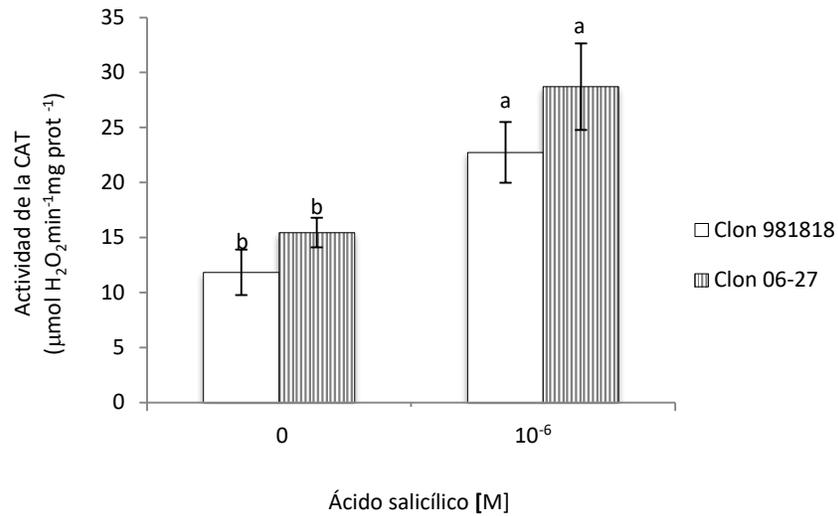


Figura 12. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$)

7.5.2 Actividad de la peroxidasa

Las yemas pretratadas en AS del clon 981818 mostraron un incremento de 2.2 veces, así como una disminución del 83.6 % en las yemas del clon 06-27 en la actividad de la peroxidasa, ambos clones respecto al control después de 12 h de regeneración (Fig. 13).

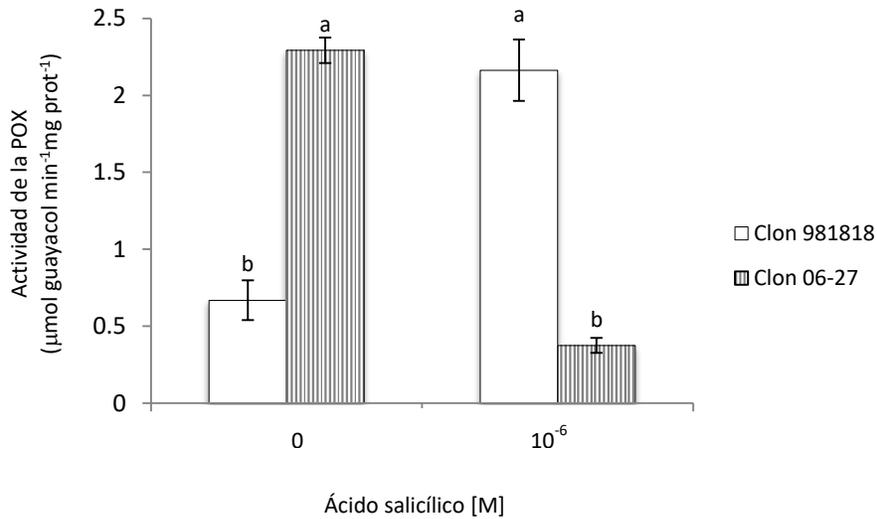


Figura 13. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$)

Las yemas pretratadas en AS del clon 981818 mostraron un incremento de 1.5 veces en la actividad de la peroxidasa y de 99 % en las yemas pretratadas de AS del clon 06-27, ambas respecto al control a las 72 h después de la regeneración (Fig.14).

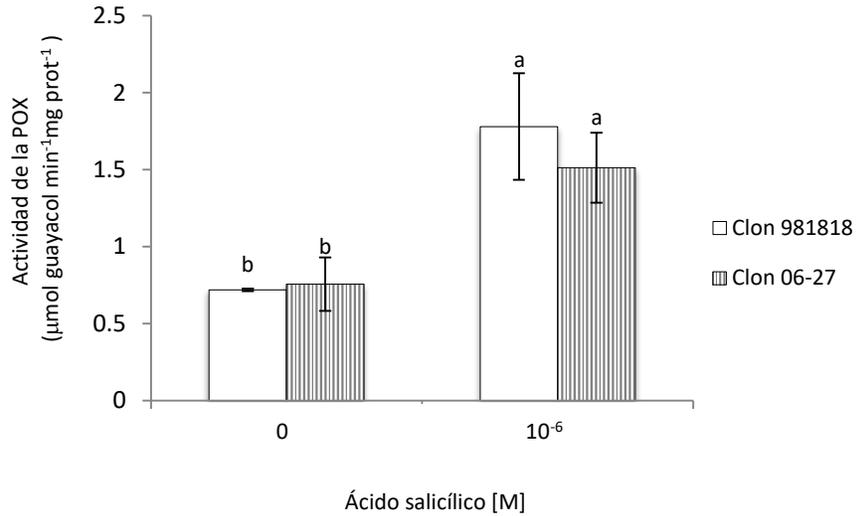


Figura 14. Efecto del ácido salicílico en la actividad de la peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.5.3 Contenido de peróxido de hidrógeno H₂O₂

A las 12 h de regeneración, las yemas pretratadas en AS del clon 981818 mostraron una disminución del 71.0 % y del 31.4 % en las yemas pretratadas de AS del clon 06-27 en el contenido de H₂O₂, ambas respecto al control (Fig. 15).

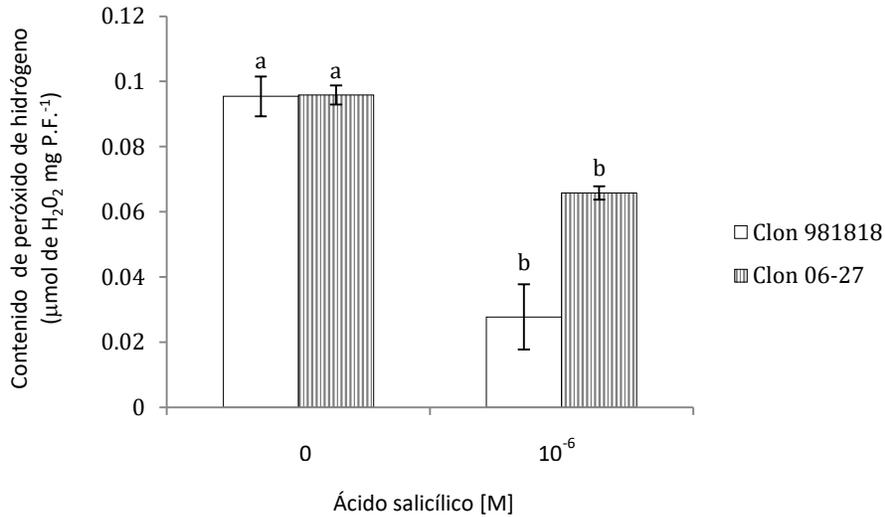


Figura 15. Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha=0.05$)

Las yemas pretratadas en AS del clon 981818 y 06-27 mostraron un decremento del 56.0% y 46.5% respectivamente, en el contenido de H_2O_2 , ambos en contraste al control a las 72h después su regeneración de criogenia (Fig. 16).

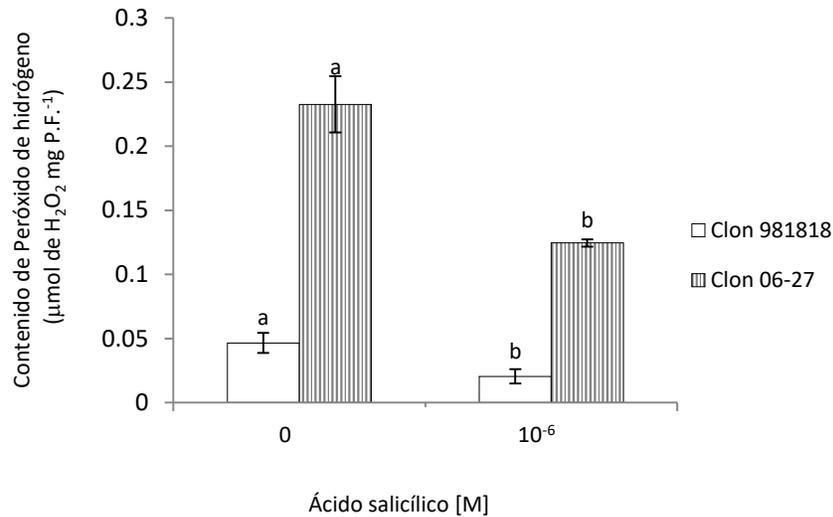


Figura 16. Efecto del ácido salicílico en el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.5.4 Contenido de prolina

Después de 12 h de haber sido sometidas a criogenia, las yemas pretratadas con AS del clon 981818 no presentaron diferencias significativas en el contenido de prolina, mientras que las yemas pretratadas con AS del clon 06-27 mostraron un incremento 1.06 veces, ambos con respecto al control (Fig. 17).

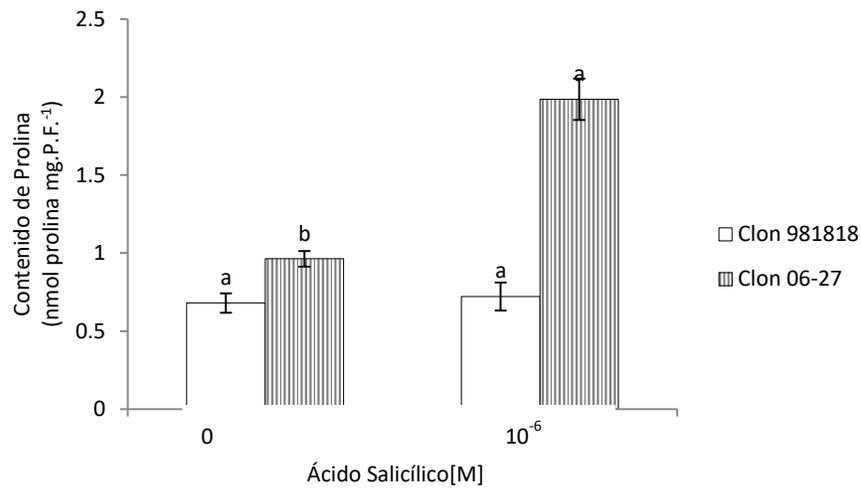


Figura 17. Efecto del ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha=0.05$).

Las yemas pretratadas con AS del clon 981818 mostraron un decremento del 22.0 % en el contenido de prolina y un incremento de 16.3 % en las yemas del clon 06-27, ambos casos respecto al control a las 72 h después ser sometidas a criogenia (Fig. 18).

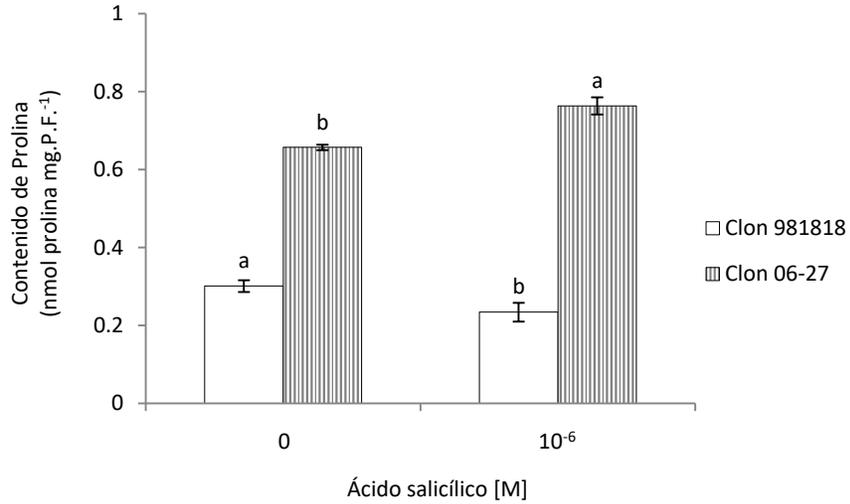


Figura 18. Efecto del ácido salicílico en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de AS, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.6 Altura de la vitroplanta, número de entrenudos, longitud de la raíz y peso fresco de vitroplantas en respuesta a la aplicación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

En el clon 981818 y 06-27 las vitroplantas provenientes de tratamientos de H₂O₂, mostraron en la altura de la vitroplanta una disminución respecto al control del 44.6 % y 35.1 % respectivamente en la concentración de 5 mM, mientras que para la concentración de 10 mM se presentaron disminuciones del 45.9 % y 56.2 % respectivamente, ambos clones en contraste con sus controles a los 30 días posteriores a la incubación (Fig. 19).

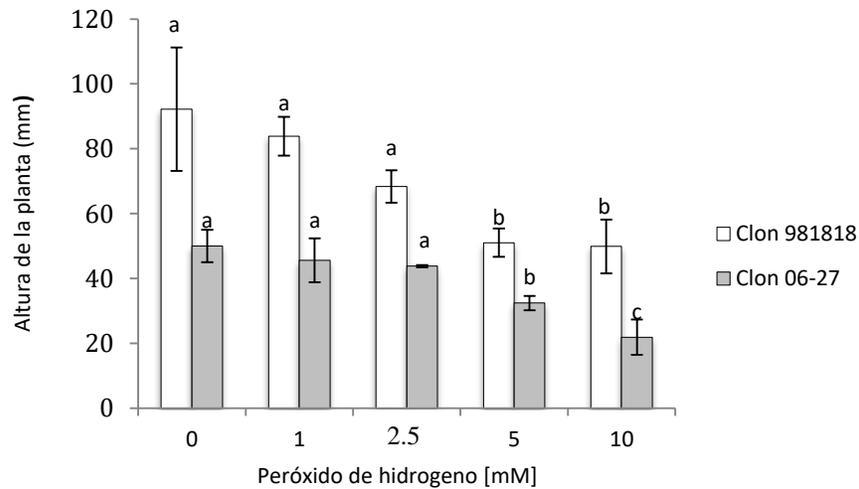


Figura 19. Efecto de la incubación en H₂O₂ en la altura de la vitroplanta en 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H₂O₂ y sembrados en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

En el clon 981818 las plantas provenientes de tratamientos de H_2O_2 mostraron una disminución en la longitud de la raíz respecto al control del 27.8 %, 43.6 %, 46.44 % y 53.3 % en las concentraciones de 1 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM respectivamente a los 30 días posteriores a la incubación (Fig. 20). En el clon 06-27 las plantas provenientes de tratamientos de H_2O_2 mostraron una disminución en la longitud de la raíz respecto al control del 36.5 %, 30.4 %, 23.4 % y 21.1 % en las concentraciones de 1 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM respectivamente, a los 30 días de edad (Fig. 20).

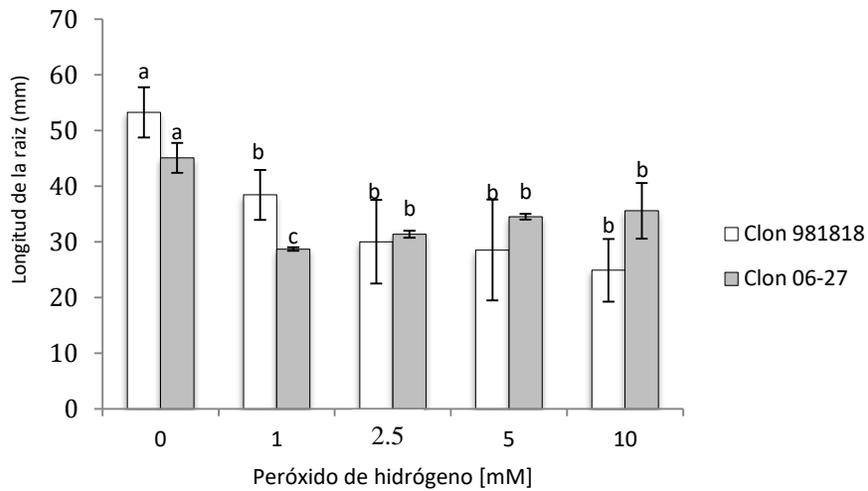


Figura 20. Efecto de la incubación en H_2O_2 en la longitud de la raíz de las vitroplantas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H_2O_2 y sembrados en medio MS. Las barras representan el promedio de 24 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

En el clon 981818 las vitroplantas provenientes de tratamientos de H₂O₂ mostraron una disminución en el peso fresco respecto al control en las concentraciones de 2.5 mM, 5 mM y 10 mM del 30.3 %, 36.4 % y 38.8 % respectivamente, a los 30 días posteriores a la incubación (Fig. 21). En el clon 06-27 las vitroplantas provenientes de tratamientos de H₂O₂ mostraron una disminución en el peso fresco respecto al control en las concentraciones de 1 mM, 2.5 mM, 5 mM y 10 mM de un 21.3 %, 36 %, 50.4 % y 39.8 % respectivamente, a los 30 días después de la incubación (Fig. 21).

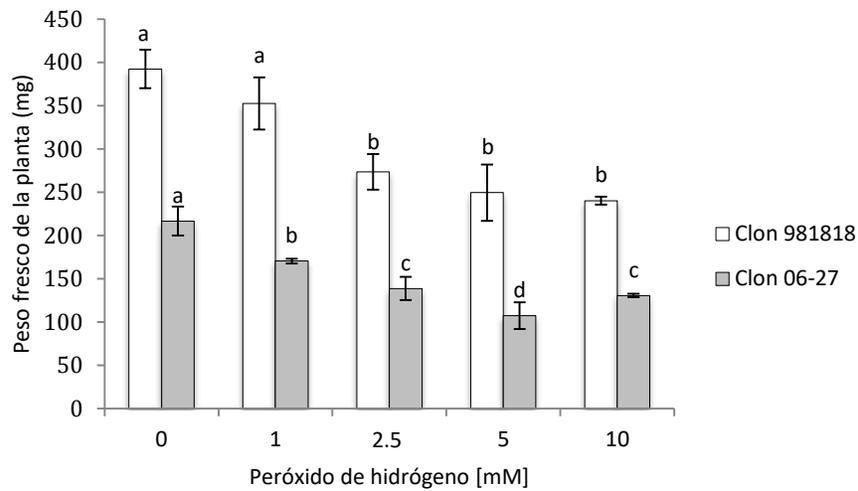


Figura 21. Efecto de la incubación en H₂O₂ en el peso fresco de las vitroplantas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Esquejes incubados por 1 h en H₂O₂ y sembrados en medio MS. Las barras son el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

A los 30 días posteriores a la incubación en peróxido de hidrógeno, las vitroplantas del clon 06-27 provenientes del tratamiento 10 mM de H₂O₂ mostraron una disminución en el número de entrenudos de un 50.51 %, mientras que vitroplantas del clon 981818 provenientes de todos los tratamientos de H₂O₂ no mostraron diferencias significativas en el número de entrenudos en plantas del clon 981818 (Fig. 22).

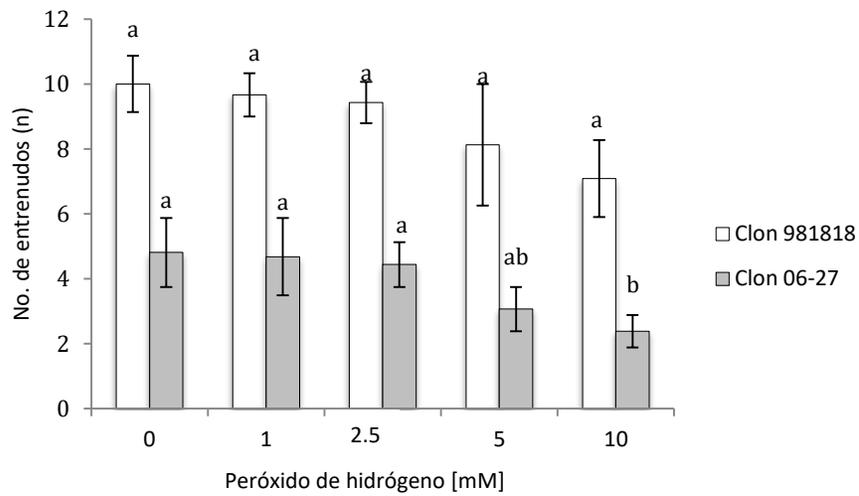


Figura 22. Efecto de la incubación en H₂O₂ en el número de entrenudos de vitroplantas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. de 30 días de edad. Esquejes incubados por 1h en H₂O₂ y sembrados en medio MS. Las barras son el promedio de 24 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

7.7 Efecto de pretratamientos de H₂O₂ en la actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina antes de someterse a criogenia

7.7.1 Actividad de la catalasa

Yemas del clon 981818 provenientes de los tratamientos de peróxido de hidrógeno en las concentraciones de 1 mM y 5 mM, mostraron un incremento respecto al control de 45.4 % y 23.3 % veces, correspondiente a cada tratamiento (Fig. 23). Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes de los tratamientos de peróxido de hidrógeno en las concentraciones de 1 mM y 5 mM presentaron un decremento respecto al control de un 30.7 % y 46.1 % correspondiente a cada tratamiento (Fig. 23).

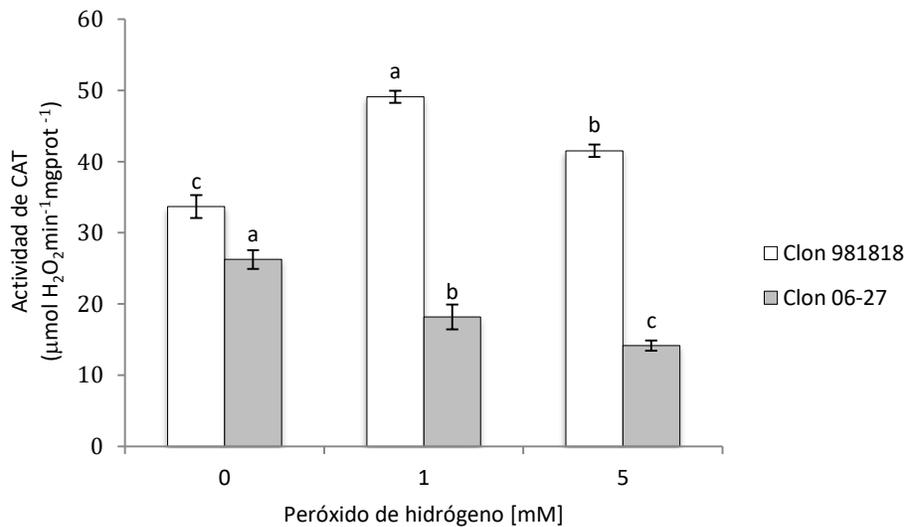


Figura 23. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la catalasa (CAT), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días posteriores a la incubación en H₂O₂. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.7.2. Actividad de la peroxidasa

En el clon 981818 las yemas de *Solanum tuberosum* L. provenientes del tratamiento 1 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en la actividad de la peroxidasa del 44 % respecto al control, mientras que las yemas provenientes del tratamiento 5 mM de H₂O₂ no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 24). En el clon 06-27 los microesquejes provenientes de los tratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en la actividad de la peroxidasa del 75.3 % y 1.3 veces respectivamente, en contraste con el control. (Fig. 24).

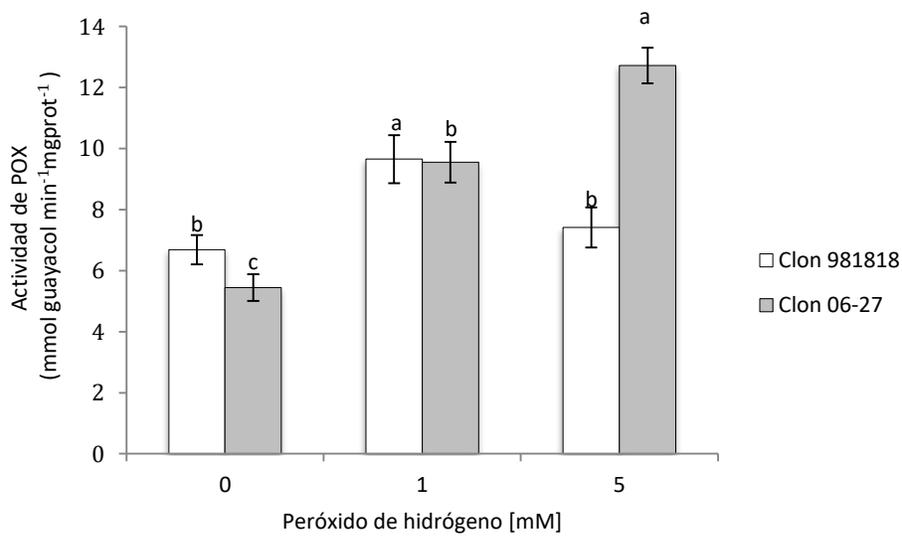


Figura 24. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la peroxidasa (POX), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días posteriores a la incubación en H₂O₂. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.7.3 Contenido de peróxido de hidrógeno

En yemas del clon 981818 provenientes de los tratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂, se observó un incremento respecto al control en el contenido de peróxido de 1.1 y 2.1 veces respectivamente (Fig. 25). Las yemas del clon 06-27 provenientes del tratamiento 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en el contenido de peróxido del 44.5 % respecto al control (Fig. 25).

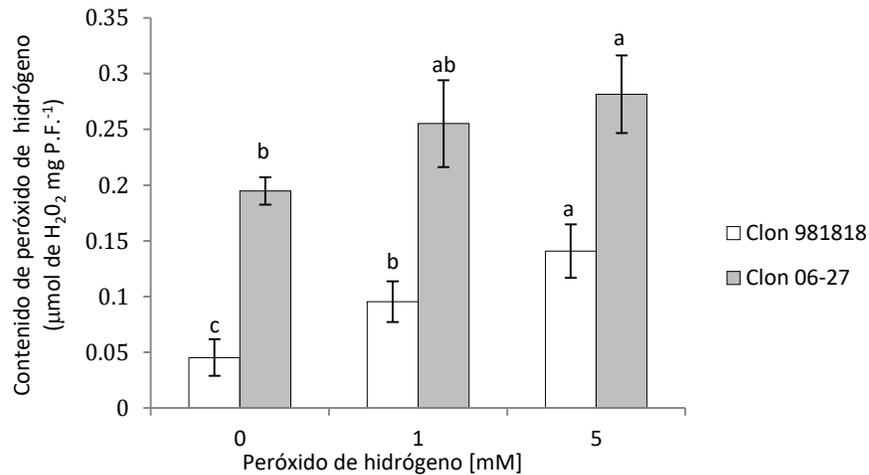


Figura 25. Efecto del peróxido de hidrógeno, en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) antes de criogenia, en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días posteriores a la incubación en H₂O₂. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.7.4 Contenido de prolina

Yemas de los clones 981818 y 06-27 de *Solanum tuberosum* L. provenientes de los tratamientos de peróxido de hidrógeno no mostraron diferencias significativas respecto al control en el contenido de prolina (Fig. 26).

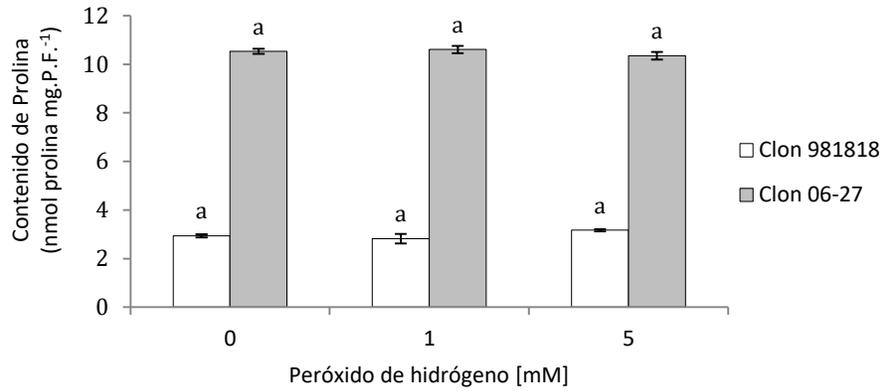


Figura 26. Efecto del peróxido de hidrógeno en el contenido de prolina (Pro), antes de criogenia en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a los 30 días posteriores a la incubación en H₂O₂. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.8 Potencial hídrico en yemas de dos clones pretratados con peróxido de hidrógeno, en la etapa de deshidratación en el método criogénico D-crioplaca

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes de los tratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en el potencial hídrico de un 19.1 % y 23.7 % respectivamente, en contraste al control (Fig. 27). En yemas de papa del clon 06-27 provenientes de los tratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento del 15.5 % y 16% respectivamente, en el potencial hídrico en contraste con el control (Fig. 27).

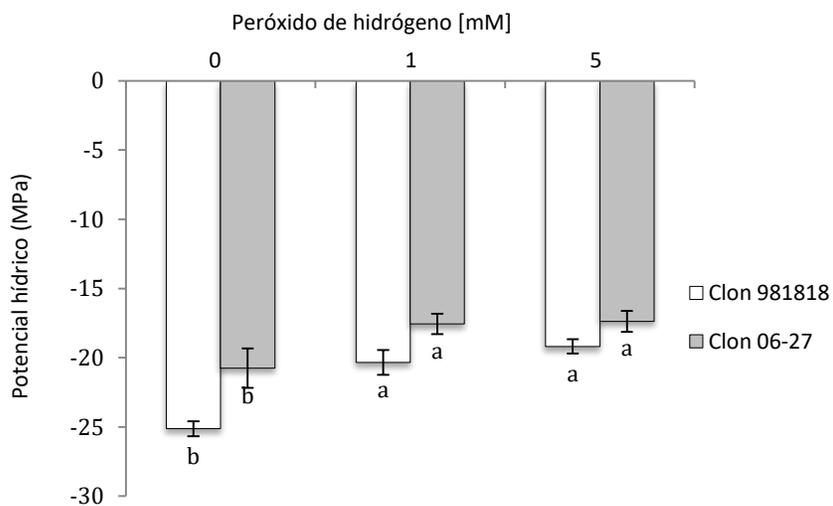


Figura 27. Efecto del tratamiento de peróxido de hidrógeno en el potencial hídrico (Ψ_A), después de la deshidratación durante criogenia, en 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Las barras representan el promedio de 9 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.9 Efecto de pretratamientos de H₂O₂ en la supervivencia a criogenia

En el clon 981818 las yemas de *Solanum tuberosum* L. provenientes de los tratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ y sometidas a criogenia, mostraron un incremento en la supervivencia de 2.3 y 1.6 veces respectivamente, en comparación con el control. En el clon 06-27 las yemas de papa provenientes del tratamiento 1 y 5 mM de H₂O₂, después de ser sometidas a criogenia, mostraron un incremento en la supervivencia del 100 % y 58.3 % respectivamente, en comparación con el control (Fig. 28).

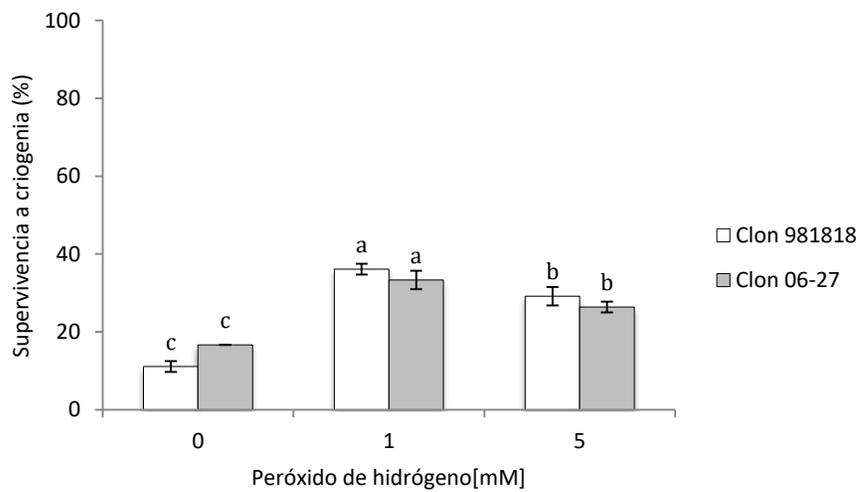


Figura 28. Efecto del peróxido de hidrógeno en la supervivencia después de criogenia, de yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas por 3 días. Las barras representan el promedio de 72 observaciones \pm E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas dentro de clones (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.10 Actividad enzimática de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina, a las 12 y 72h de regeneración después de criogenia con un pretratamiento de ácido salicílico

7.10.1 Actividad de la catalasa

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 y 06-27 provenientes del pretratamiento 5 mM de H₂O₂, mostraron un incremento en la actividad de la catalasa del 47.8 % y 48.3 %, mientras que las yemas de ambos clones provenientes del pretratamiento de 1 mM no mostraron diferencias significativas respecto al control, después de someterse a criogenia y permanecer 12 h en medio de regeneración (Fig. 29).

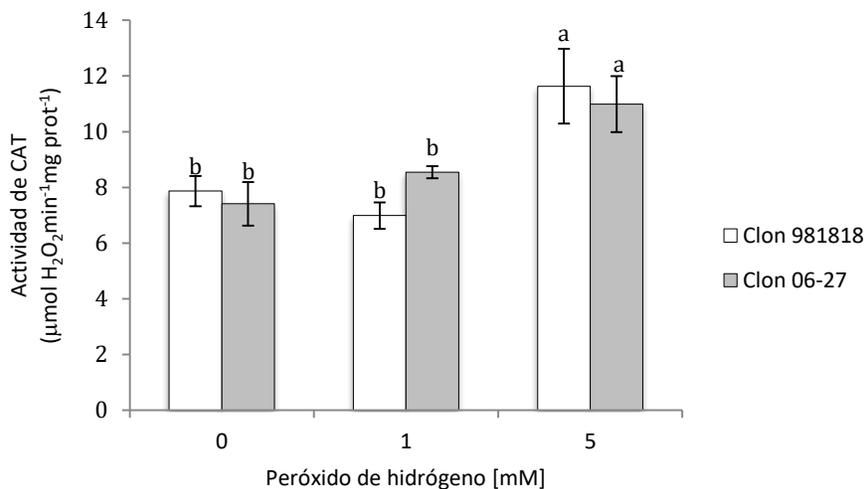


Figura 29. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento respecto al control en la actividad de la catalasa después de someterse a criogenia y permanecer 72 h en medio de regeneración del 64.5 % y 51.4 % respectivamente (Fig. 30). Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento respecto al control en la actividad de la catalasa, después de someterse a criogenia y permanecer 72 h en medio de regeneración de 53.9 % y 90 % respectivamente (Fig. 30).

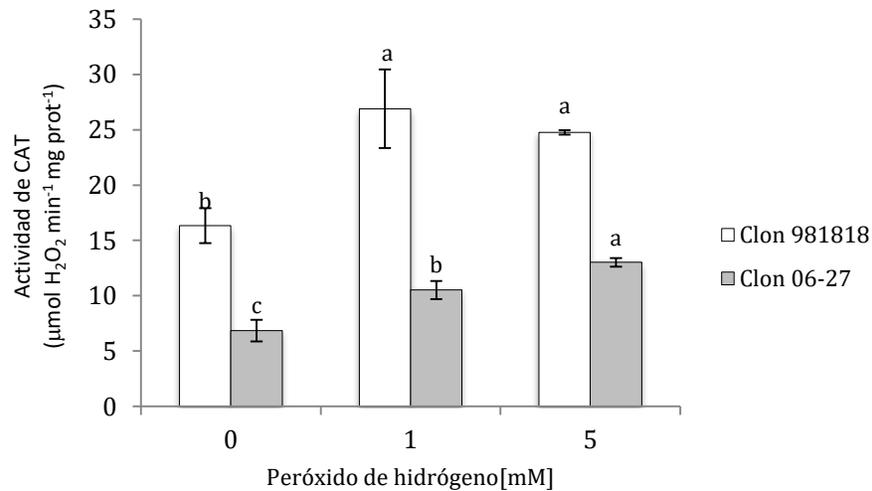


Figura 30. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la catalasa (CAT), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.10.2 Actividad de la peroxidasa

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes del pretratamiento 5 mM de H₂O₂, mostraron un incremento en la actividad de la peroxidasa a las 12 h en medio de regeneración después de criogenia del 71 % respecto al control, mientras que las yemas del clon 06-27 provenientes de ambos tratamientos, así como las yemas provenientes del tratamiento 1 mM de peróxido de hidrógeno, no presentaron diferencias significativas en la actividad de la peroxidasa en contraste a sus controles (Fig. 31).

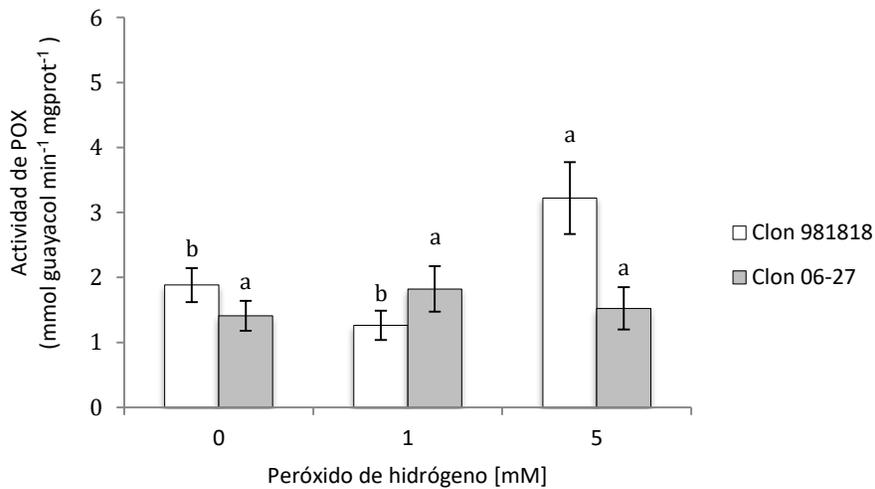


Figura 31. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

Las yemas del clon 981818 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en la actividad de la peroxidasa, después de someterse a criogenia y permanecer 72 h en medio de regeneración con un incremento estadísticamente significativo de 3.6 y 2.6 veces respectivamente, en contraste con el control (Fig. 32). Yemas del clon 06-27 provenientes de los pretratamientos de 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento estadísticamente significativo a las 72 h de regeneración en la actividad de peroxidasa de 2.1 y 1.6 veces respectivamente a cada tratamiento y tomando como referencia al control (Fig. 32).

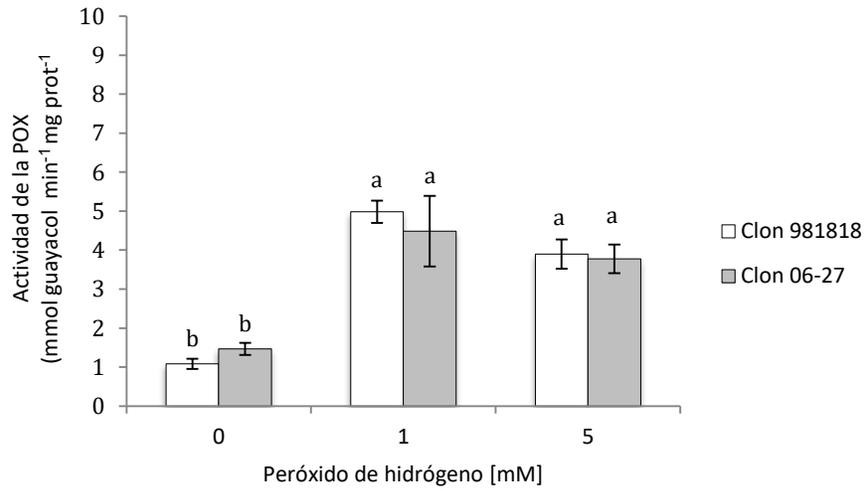


Figura 32. Efecto del peróxido de hidrógeno en la actividad de la peroxidasa (POX), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.10.3 Contenido de peróxido de peróxido de hidrógeno

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes del pretratamiento 5 mM de H₂O₂ mostraron una disminución en el contenido de peróxido de hidrógeno a las 12 h de ser regeneradas del 54.0 % respecto al control, mientras que las yemas de papa provenientes del pretratamiento de 1 mM no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 33). Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron una disminución respecto al control en el contenido de peróxido de hidrógeno después de someterse a criogenia y permanecer 12 h en medio de regeneración del 51.8 % y 33 % respectivamente (Fig.33).

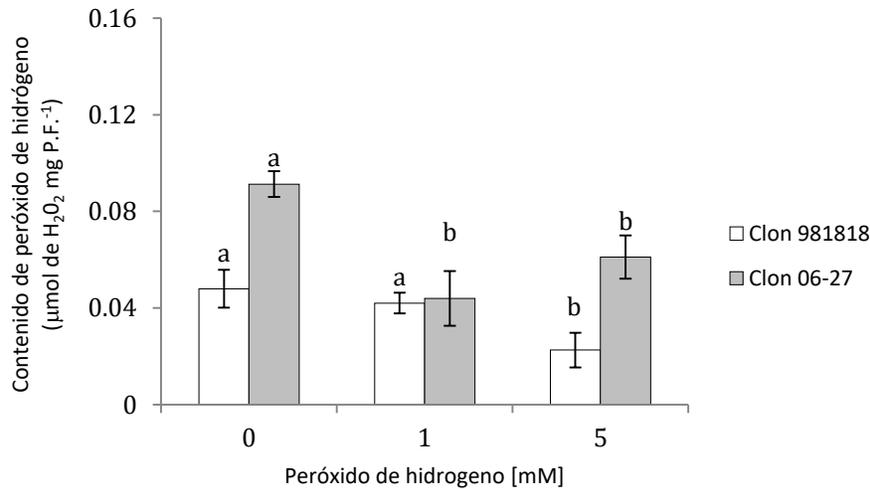


Figura 33. Efecto del peróxido de hidrógeno en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

Las yemas del clon 981818 provenientes del pretratamiento 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento de 3 veces respecto al control, mientras que las yemas de papa provenientes del pretratamiento de 1 mM no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 34). Las yemas del clon 06-27 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron una disminución en el contenido de peróxido de hidrógeno después de someterse a criogenia y permanecer 72 h en medio de regeneración con una disminución de un 58.6 % y 67.7 % respecto al control (Fig. 34).

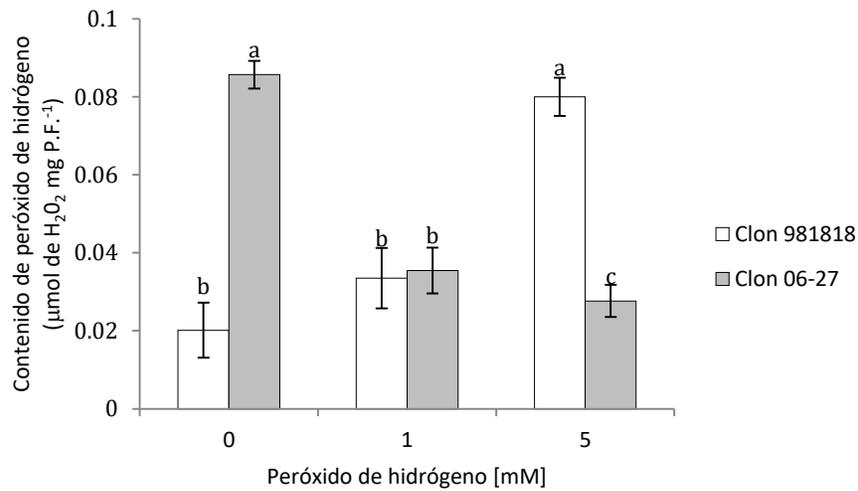


Figura 34. Efecto del peróxido de hidrógeno, en el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

7.10.4 Contenido de prolina

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento respecto al control en el contenido de prolina a las 72 h de ser regeneradas del 77.6 % y 1.5 veces respectivamente (Fig. 35). Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento del contenido de prolina después de someterse a criogenia y permanecer 12 h en medio de regeneración de 5.0 y 6.6 veces respectivamente a cada tratamiento, en contraste con el control (Fig. 35).

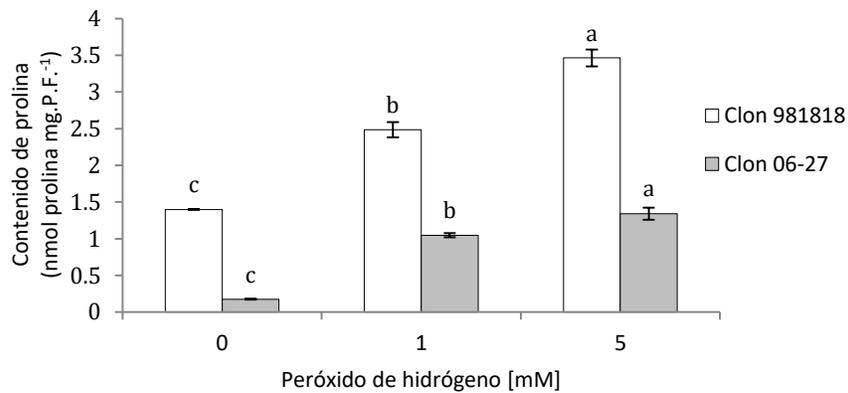


Figura 35. Efecto del peróxido de hidrógeno en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 12 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, α=0.05).

Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes de los pretratamientos 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en el contenido de prolina a las 72 h de ser regeneradas, del 37.1 % y 90.1 % respecto al control (Fig. 36). Las yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes del pretratamiento 1 mM mostraron una disminución en el contenido de prolina de un 25.1 % respecto al control y las yemas provenientes de la concentración 5 mM de H₂O₂ mostraron un incremento en el contenido de prolina del 36.6 %, respecto al control (Fig. 36).

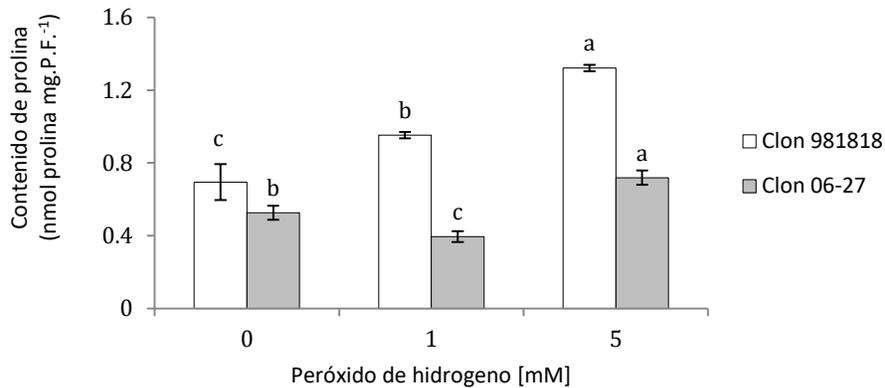


Figura 36. Efecto del peróxido de hidrógeno en el contenido de prolina (Pro) en yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. a las 72 horas posteriores a la regeneración. Yemas provenientes de tratamientos de H₂O₂, diseccionadas, sometidas a criogenia y regeneradas. Las barras representan el promedio de 9 observaciones ± E.S. Letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del efecto del ácido salicílico en parámetros de crecimiento en *Solanum tuberosum* L.

El efecto de la incubación en AS (10^{-5} , 10^{-6} M) en parámetros de crecimiento ha sido reportado anteriormente en microplantas de papa, donde se observó un incremento del peso fresco, la longitud de tallo y raíz (Ruiz-Saenz *et al.*, 2019) antes de someterse a crioterapia. En contraste con lo anterior, la misma concentración de AS (10^{-6} M) utilizada en esta investigación con microplantas del clon 981818 presentó una disminución en las mismas variables (Fig. 1, 2, 3) y microplantas del clon 06-27 mostraron una reducción en la longitud de raíz (Fig. 1), sin cambios en los demás parámetros estudiados (Fig. 2, 3, 4).

En microplantas del clon 981818 incubadas con AS (10^{-6} M), se observó un efecto de inhibición en el crecimiento (Fig. 1, 2), al igual que se reporta una inhibición de tallos y raíces en microplantas de papa en presencia de AS en la concentración de 0.1 mM (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006). Los clones 981818 y 06-27 mostraron una disminución significativa en la altura de la planta en presencia de AS (Fig.1), efectos de reducción de longitud de tallos de microplantas de papa se han reportado al utilizar salicilatos, específicamente en presencia de ácido acético salicílico, en concentraciones de 250-750 μ M (López-Delgado *et al.*, 1998).

En esta investigación las microplantas del clon 981818 presentaron un aumento en el contenido de H_2O_2 (Fig. 7) y una disminución de la actividad en las enzimas CAT y POX (Fig. 5, 6), lo cual se refleja en una disminución general de su crecimiento (Fig.1, 2, 3, 4), mientras que en el clon 06-27, las vitroplantas presentaron un aumento en el contenido H_2O_2 (Fig.7) y la actividad de POX (Fig. 6) además de una disminución en la actividad de la CAT (Fig.5), por lo que podemos inferir que la presencia AS es genotipo dependiente (Mora-Herrera y López-Delgado *et al.*, 2006) y interacciona con el AS en parámetros de crecimiento vegetal y en el sistema antioxidante enzimático (CAT, POX ; Arfan 2009; Khan *et al.*, 2016).

8.2 Evaluación del efecto de ácido salicílico en la supervivencia en *Solanum tuberosum* L.

La respuesta fisiológica obtenida por incubaciones de AS en microplantas de papa (Fig. 1, 2, 3), ha sido reportada en clones de papa, donde se mostro el efecto de inducción de tolerancia a criogenia (Ruiz-Saenz *et al.*, 2019), al igual que se encontró en esta investigación (Fig. 10). La evaluación de parámetros de crecimiento como los de la presente investigación (Fig. 1, 2, 3, 4), aporta información sobre el estado fisiológico del explante antes de criogenia, complementado con su estado enzimático en la CAT (Fig.5), la POX (Fig.6) y contenidos de H₂O₂ (Fig.7) y Prolina (Fig.8), lo cual podrían dilucidar los posibles mecanismos involucrados en un aumento de la supervivencia (Fig.10). En concordancia con Kaczmarczyk *et al.* (2012), donde se expone que las condiciones previas a criogenia tienen un efecto directo en la supervivencia y regeneración.

En papa los porcentajes de supervivencia suelen fluctuar dependiendo de la especie y el genotipo, como los reportados en la recopilación de Kaczmarczyk *et al.* (2012), en esta investigación los porcentajes obtenidos fueron de un 8.3 % para el clon 981818 y un 17.7 % en el clon 06-27 en ausencia de AS (Fig. 10).

Cuando los porcentajes de supervivencia o regeneración son bajos, los medios se adicionan con reguladores del crecimiento en la fase inicial o final a criogenia, algunos ejemplos son: zeatina, AIA (ácido indolacético), BAP (bencilaminopurina), ANA (ácido naftalenacético) y GA₃ (Giberelico; Hirai y Sakai, 1999). En este estudio en ninguna etapa se adicionaron fitohormonas, la adición de AS en el medio de cultivo es una alternativa al uso de fitohormonas, ya que de igual manera incrementa los porcentajes de supervivencia (Fig.10).

La incubación de moléculas relacionadas con la tolerancia a temperaturas bajas como AS ha sido probado en criogenia para aumentar los porcentajes de supervivencia y regeneración en especies como *Vitis vinifera* (Pathirana *et al.*, 2016), *Melia azedarach* (Bernard *et al.*, 2002) y *Solanum tuberosum* L. (Ayala-Hernandez *et al.*, 2019), en el presente trabajo en papa se confirmó que el uso de AS es una alternativa como tratamiento antes de criogenia, para la inducción de tolerancia a criogenia, al incrementar los porcentajes de supervivencia (Fig.10).

Los factores involucrados en los procesos criogénicos como son, la producción de las EROS, la actividad enzimática y la acumulación de osmolitos han empezado a ser estudiados en diversas especies y en las diferentes fases de la criogenia (Poobathy *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Previamente incubaciones de AS realizadas en microplantas de papa mostraron una inducción de tolerancia a crioterapia, con efectos deseables en regeneración en procesos criogénicos (Ruiz-Saenz *et al.*, 2019).

Las yemas de los clones 981818 y 06-27 provenientes del tratamiento de AS mostraron que la supervivencia podría estar ligada a la fase de precultivo (Fig. 5, 7, 8), ya que de manera similar a lo descrito por Pathirana *et al.*, (2016), la presencia de AS en el medio de cultivo por varias semanas induce una respuesta de tolerancia a criogenia, aumentando los porcentajes de supervivencia y regeneración. Un aumento general de la supervivencia en yemas de ambos genotipos provenientes de AS, puede estar ligado a una respuesta en común en la fase anterior a criogenia, observándose que la concentración de 10^{-6} M de AS induce una reducción de la actividad de la CAT (Fig.5), un aumento del contenido de H_2O_2 (Fig.7) y un aumento en la acumulación de Pro (Fig.8) independientemente del genotipo.

El estado fisiológico y bioquímico de los explantes es considerado un aspecto importante en la criopreservación, siendo esencial para obtener condiciones exitosas de deshidratación, tolerancia a baja temperatura y regeneración (Sakai y Engelmann 2007). Niveles bajos de la actividad de la CAT y la APX se reportan en la etapa previa a criogenia en *Passiflora Suberosa* con una relación de supervivencia del 40.0 % (Vianna *et al.*, 2019), lo cual coincide con resultados presentes en esta investigación donde yemas de 2 clones de *Solanum tuberosum* L. y proveniente del tratamiento de AS mostraron una actividad de la CAT baja en la fase previa a criogenia (Fig.5) pero valores de supervivencia de entre 25- 34.3 % (Fig. 10) .

En el presente estudio yemas incubadas en AS, presentaron un mismo patrón de respuesta en el contenido de peróxido de hidrógeno, a lo largo del proceso criogénico en las 3 fases evaluadas (Fig. 7, 15, 16), un incremento de los niveles de H_2O_2 en la fase anterior a criogenia pudo ser un disparador de mecanismos de señalización (Fig. 7), resultando en la fase posterior en un

incremento de la actividad enzimática de la CAT (Fig.12) y la POX (Fig. 14), en la fase de regeneración a las 72 h y conduciendo a un aumento de la supervivencia (Fig. 10). En concordancia con la descripción de Vianna *et al.*, (2019), donde se menciona que una reducción de las EROS en la fase posterior a criogenia, esta relacionada con un aumento en la actividad enzimática como se observo en *Passiflora suberosa* .

Para poder explicar mas a fondo, los resultados se abordaron en cada fase, así como los mecanismos relacionados, a fin de analizar si la presencia de AS induce un mecanismo general en clones de papa ó si existen múltiples mecanismos que se expresan y que permiten de forma acumulativa inducir un aumento en los porcentajes de supervivencia.

8.3 Efecto del Ácido Salicílico en la actividad enzimática la CAT, la POX y los contenidos de H₂O₂ y Pro antes de criogenia

La catalasa (CAT) es una enzima que se ha reportado que se inhibe en presencia del AS en concentraciones de 0.01 y 0.1 mM (Mora-Herrera *et al.*, 2005). De igual manera incubaciones de AS en microplantas de papa en los clones 981818 y 06-27, presentaron una disminución en la actividad de la CAT (Fig. 5). Una disminución de la actividad de la CAT, puede conducir directamente a una acumulación de H₂O₂ desencadenando la cascada de señalización ante estrés a frío o congelamiento (Hossain *et al.*, 2015). Una acumulación en ambos clones del contenido de H₂O₂ (Fig.7), se mostró con relación a una disminución en la actividad de la CAT (Fig.5), en la presente investigación en plantas pretratadas con AS, lo cual coincide con lo observado por López-Delgado *et al.*, (2018), donde reportaron un incremento del contenido de H₂O₂ inducido por una disminución de la CAT en plantas de papa asperjadas con AS 10⁻⁵ M antes de ser expuestas a -6 °C (López-Delgado *et al.*, 2018).

Por otra parte, la actividad de la peroxidasa (POX) mostró un patrón opuesto entre las yemas pretratadas con AS de los clones 981818 y 06-27 (Fig.6). El incremento de la actividad de la POX y una disminución en la actividad de la CAT, solo se presentó en yemas del clon 06-27 en presencia de AS (Fig.6). Un aumento de la actividad enzimática en frío se ha reportado, enzimas como la ascorbato peroxidasa (APX), la guayacol peroxidasa (POX) y la glutathion reductasa (GR)

junto con una disminución de la actividad de la catalasa durante aclimatización a frío (Kocsy *et al.*, 2001; Baek y Skinner 2012; Janda *et al.*, 2015). Saleem *et al.*, (2020) han reportado que la aclimatización induce *per se* una acumulación endógena de moléculas como el AS, lo cual podría inducir los mecanismos de señalización anteriormente mencionados.

La actividad de la POX y su correlación con la tolerancia al congelamiento en criogenia ha sido poco explorada, pero se ha demostrado que la actividad de la POX se incrementa en presencia de agentes osmóticos, mientras los niveles de la CAT bajan, aún así los tratamientos mejoran la supervivencia en embriones somáticos de olivo, (Lynch *et al.*, 2011), lo anterior indica una posible relación entre la supervivencia a criogenia (Fig.10), ligada a los niveles enzimáticos previo en la actividad de la POX en yemas del clon 06-27 proveniente de la incubación de AS, en conjunto con la actividad enzimática de la CAT (Fig.5).

Mientras que la relación entre una disminución de la actividad de la POX en yemas pretratadas con AS del clon 981818 (Fig. 6), más una disminución de la actividad de la CAT (Fig. 5), puede estar relacionada con un aumento en los niveles de Pro (Fig. 8), como se ha reportado en callos de *O. Europea*, donde un tratamiento osmótico previo a criogenia, disminuyó la actividad enzimática de la CAT y la POX, pero incremento los niveles de Pro, resultado en un aumento significativo de la supervivencia en criogenia (Lynch *et al.*, 2011). Lo cual indica que la actividad de la POX previa a la exposición a temperaturas bajas o ultrabajas puede inducir tolerancia dependiente de la sensibilidad del genotipo.

La acumulación de H₂O₂ en plantas de *Solanum tuberosum* L. pretratadas con AS antes de someterse a frío ó congelamiento ha sido reportado en diversos trabajos (Mora-Herrera *et al.*, 2005; Mora-Herrera y López-Delgado, 2006; López-Delgado *et al.*, 2018), respuesta similar encontrada en yemas de los clones 981818 y 06-27 de *Solanum tuberosum* antes de ser sometidos a criogenia (Fig. 7), donde se observó una disminución de la actividad de la CAT (Fig.5), generando cambios en el sistema antioxidante en la fase de regeneración, resultando en un incremento significativo en la supervivencia de ambos clones (Fig. 10). Una disminución en la actividad de la CAT puede conducir a la acumulación de H₂O₂. en diversas fases en los procesos criogénicos (Poobathy *et al.*, 2013).

Este incremento de los niveles de H₂O₂ conduce a la señalización y producción de moléculas que inhiben su sobreproducción, como lo son acumulación de azúcares o producción de osmolitos como prolina o glicina betaína que evitan los daños celulares (Kumar y Yadav 2009; Iqbal *et al.*, 2015; Noreen *et al.*, 2018) Lo anterior coincide con la respuesta presente en esta investigación donde yemas pretratadas con AS de los clones 981818 y 06-27 mostraron un incremento del contenido de H₂O₂ (Fig. 7), una disminución de la actividad de la CAT (Fig.5) y un incremento del contenido de Pro (Fig. 8) antes de criogenia.

En el presente trabajo se observó un incremento en el contenido de prolina en yemas pretratadas con AS de *Solanum tuberosum* L. de los clones 981818 y 06-27 (Fig.8) lo cual coincide con lo descrito por Eraslan *et al.*, (2007) donde la aplicación de AS regula la acumulación de prolina y reduce la acumulación de iones tóxicos en raíces. Hayat *et al.*, (2010) menciona que la presencia de AS en diversos niveles organizacionales en la célula conduce a un incremento en la producción y acumulación de prolina en presencia de factores de estrés biótico o abiótico, particularmente Pro mantiene el balance redox en la homeostasis celular durante estrés y puede mitigar el efecto dañino de las EROS (Ignatenko *et al.*, 2019). Niveles superiores de supervivencia están ligados a la presencia de Pro (Lynch *et al.*, 2011; Georgieva *et al.*, 2014; Vianna *et al.*, 2019), en la fase previa a criogenia, como se muestra en este trabajo en yemas de microplantas incubadas en AS (Fig.8).

En criogenia la inducción de osmolitos es sumamente importante ya que se ha demostrado que estos ayudan a la estabilización de la membrana plasmática durante los diversos estadios en los procesos criogénicos (Georgieva *et al.*, 2014; Vianna *et al.*, 2019). Lo cual podría ser un factor relacionado con el incremento en los porcentajes de supervivencia de yemas pretratadas con AS y sometidas a criogenia (Fig. 10) del presente trabajo de investigación.

8.4 Efecto del pretratamiento de Ácido Salicílico en *Solanum tuberosum* L. en el potencial hídrico en la deshidratación en el método criogénico D-crioplaca

El incorporar o modificar los protocolos como la adición de moléculas antioxidantes como pretratamientos puede reducir el riesgo de daños celulares importantes. La adición de compuestos con cualidades crioprotectantes, en el precultivo se realiza con agentes osmóticos (Rajasekharan, 2006; Lynch *et al.*, 2011), los cuáles incrementan de forma indirecta los niveles de enzimas antioxidantes y los niveles endógenos de AS, H₂O₂ y osmolitos (Lynch *et al.*, 2011). La cristalización del agua se puede evitar disminuyendo el punto de congelamiento, adicionando altas concentraciones de solutos, hasta que la solución líquida se vuelva cada vez más viscosa a medida que la temperatura disminuye, volviéndose un sólido vítreo. (Meryman 1977). La reducción de agua celular es crucial para una criopreservación exitosa, los métodos empleados en la deshidratación en criogenia carecen de una base cuantitativa y solo son reportados por estadios de tiempos en soluciones vitrificadoras, flujo laminar o gel sílica. Esto requiere que se establezca la relación termodinámica entre el estado energético del agua en el aire (potencial hídrico, Ψ_A) y el del agua contenida en el tejido seco (Livingston *et al.*, 1992, Liang y Sun 2000). En este trabajo yemas provenientes de pretratamientos de AS de los clones 981818 y 06-27 mostraron un aumento en el potencial hídrico en deshidratación a los 90 min en gel sílica con un valor de entre -18.87 y -18.22 MPa (Fig. 9), con un incremento de los porcentajes de supervivencia después de criogenia (Fig. 10). Los valores anteriores coinciden con Percy *et al.*, (2001) donde se reporta una alta regeneración de embriones somáticos de *Picea glauca* deshidratados en condiciones controladas y sometidos a criogenia, los cuales mostraron valores de Ψ_A de entre -15 y -20MPa en la deshidratación y que indica que son valores cercanos a los límites apoplásticos.

Yemas del clon 06-27 del grupo control mostraron un Ψ_A de -20.81 MPa (Fig. 9), lo cual indica que se encuentran al borde del límite de Ψ_A ideal que propone Percy *et al.*, (2001) mientras que las yemas del clon 981818 del grupo control mostraron un Ψ_A de -24.98 MPa (Fig. 9) y una supervivencia sumamente baja de 8.33 % (Fig. 10). Valores más altos o más bajos de potencial hídrico reducen significativamente los porcentajes de supervivencia en los explantes regenerados como reporta Percy *et al.*, (2001). Los efectos adversos de la deshidratación y la oxidación pueden minimizarse incorporando antioxidantes en el medio de cultivo previo a criogenia. Tal como se muestra en plantas pretratadas con AS y sometidas a deshidratación en el procesos de criogenia de este estudio (Fig. 9). La adición de los agentes inductores ha sido probado exitosamente en la criopreservación de kiwi (Mathew *et al.*, 2018), mora (Uchendu *et al.*, 2010) y *Vitis vinífera* (Volk

et al., 2018). Siendo este el primer reporte en papa donde se realiza la medición del potencial hídrico, en la fase de deshidratación de manera reproducible como alternativa de la estandarización de protocolos de especies de interés. El establecer formas mas cuantitativas de evaluación de la deshidratación en los tejidos, ayudara a mejorar e implementar los métodos criogénicos en diversas especies de interés.

8.5 Efecto del pretratamiento de AS en *Solanum tuberosum* L. en la CAT, la POX, contenidos de H₂O₂ y Pro, después de criogenia

Los niveles enzimáticos y el contenido de las EROS en los procesos criogénicos ha sido estudiados en especies de *Hypericum* (Georgieva *et al.*, 2014), protocormos de *Dendrobium* (Jia *et al.*, 2016; Poobathy *et al.*, 2013), callos embriogénicos de *Agapanthus preacox* (Zhang *et al.*, 2015), embriones somáticos de olivo (Lynch *et al.*, 2011) y ápices de *Passiflora suberosa* (Vianna *et al.*, 2019). En esta fase se determino el efecto del AS despues de criogenia en yemas de papa en los parametros de la CAT, la POX, contenidos de H₂O₂ y Pro.

La actividad de la CAT en plantas del clon 06-27 pretratadas con AS a las 12 h y 72 h en regeneración mostraron un incremento del 56.7 y 86 % respecto al control (Fig. 11, 12) lo cual coincide con lo reportado en plantas pretratadas con ácido abscísico (ABA) donde se incrementaron los niveles de la CAT en la fase de regeneración después de criogenia en especies de *Hypericum*, con un incremento en la actividad de la CAT del 220 % para *Hypericum rumeliacum* y 115 % en *Hypericum tetrapterum* (Georgieva *et al.*, 2014). Donde se observa que moléculas involucradas en procesos de tolerancia a temperaturas bajas como el AS y el ABA pueden ser alternativas en la etapa de precultivo y con una posible activación del sistema antioxidante en la fase de regeneración, ya que el AS puede incrementar la cantidad de ABA (Scandalios *et al.*, 1997; Saleem *et al.*, 2020).

Vianna *et al.*, (2019) reportaron un decremento en la actividad de la CAT en las primeras horas de recuperación después de criogenia en ápices de *Passiflora Suberosa* y un aumento en la actividad de esta enzima a los 10 días, datos que coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación donde yemas del clon 981818 pretratadas con AS, sometidas a criogenia y

muestreadas en la fase de regeneración a las 12 h mostraron una disminución en la actividad de la CAT de un 57 % respecto al control (Fig.11), y un aumento significativo del 92 % de la actividad de la misma a los 3 días (72 h; Fig. 12). Ambos clones pretratados con AS muestran un aumento en la actividad de la catalasa en la fase de regeneración de 3 días (Fig. 12), respecto a las 12 h (Fig. 11), lo cual coincide con un aumento de la actividad de esta enzima en la criopreservación de *Passiflora Suberosa*, *Hypericum* y *Agapanthus praecox* (Vianna *et al.*, 2019; Georgieva *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

López-Delgado *et al.*, 2018 reportan que plantas provenientes de minitubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Granate pretratados con AS (10^{-5} M) y expuestos a congelamiento (-6 °C, 4h) mostraron un incremento en la actividad de la CAT y un menor contenido de H₂O₂, niveles que afectaron positivamente en la supervivencia de papa con un incremento respecto al control en la supervivencia de 1.47 veces. Resultados similares fueron obtenidos en esta investigación donde yemas provenientes de AS (10^{-6} M) del clon 06-27 y expuestas a criogenia, a las 12 h en regeneración mostraron un incremento del 57 % veces en la actividad de la CAT (Fig. 11), una disminución del contenido de H₂O₂ en un 31.35 % (Fig. 15), resultando en niveles de supervivencia con un aumento de 94.2 % veces (Fig.10).

Yemas del clon 981818 pretratadas con AS, sometidas a criogenia y cuantificadas a las 12 h en regeneración mostraron una disminución de la actividad de la CAT (Fig. 11) y de contenido de peróxido de hidrógeno (Fig. 15), aunque la CAT es la principal enzima que se encarga de dismutar al H₂O₂, existen otras enzimas encargadas de eliminar la sobreproducción de H₂O₂ como lo son las peroxidasas (la APX, la POX, la GPX; Zhang *et al.*, 2015), en este caso en suponer se puede explicar los niveles más bajos de H₂O₂ por un incremento en la actividad de la POX de 2.2 veces respecto al control a las 12 h (Fig. 13), lo cual ayudo aumentar los niveles de supervivencia (Fig. 10).

La estabilización de algunas enzimas se puede dar en un periodo de tiempo de recuperación más extenso, que depende de la especie en cuestión que se desee analizar, además de considerar que la respuesta genética individual estará presente; en este trabajo se observó que a las 12 h se

muestran algunos cambios enzimáticos y en el contenido de peróxido de hidrógeno, en respuesta celular al estrés generado en la criogenia.

A las 72h de regeneración los niveles enzimáticos de la CAT y la POX en ambos clones mostraron un aumento significativo en las yemas pretratadas con AS (Fig.12, 14) , así mismo se mostró una disminución de los niveles de H_2O_2 (Fig.16), pero sin un patrón similar en prolina (Fig.18), con un aumento en los porcentajes de supervivencia (Fig.10) lo cual indica una inducción de tolerancia a criogenia que se puede visualizar con una activación de los sistemas antioxidantes en los primeros días de regeneración en explantes de *Solanum tuberosum* L., los cuales muestran un incremento significativo en la supervivencia de ambos clones (Fig. 10).

La producción de la EROS en temperaturas bajas se presenta a lo largo del proceso criogénico. El estrés térmico (frío) genera estrés oxidativo y la producción de una gran cantidad de las EROS como O_2^- , OH^- y H_2O_2 (Mittler *et al.*, 2002), en respuesta a este incremento se activan varios sistemas enzimáticos antioxidantes como la SOD, la CAT, la POX, la APX; las cuales se pueden alterar con pretratamientos de AS en estrés térmico (Mutlu *et al.*, 2013). AS controla la expresión de varias enzimas claves como la glutatión reductasa (GR), la glutatión sintetasa (GSH sintasa), la glutatión peroxidasa (GPX), la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR), lo que refleja el rol vital del AS en la tolerancia a estrés abiótico en plantas vía ciclo del Glutatión-Ascorbato (Mustafa *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018). El AS reduce la sobreproducción de EROS mediante el ciclo del ascorbato-glutatión e induce la actividad de la SOD que se asocia con un incremento de los niveles de Ca^{+} y H_2O_2 , lo que estimula la actividad antioxidante conduciendo a la eliminación de radicales libres (Arfan 2009) y adicionalmente AS induce el metabolismo de prolina, que puede deberse a la inducción en la enzima biosintética (pirolina-5-carboxilato reductasa γ -glutamilkinasa) dando a las membranas celulares más crioestabilidad lo cual es un prerequisite de la tolerancia en plantas a frío o congelamiento (Gusta y Wisniewski 2013; Luo *et al.*, 2014).

8.6 Evaluación del efecto de peróxido de hidrógeno en parámetros de crecimiento en *Solanum tuberosum* L.

La presente investigación es el primer reporte, donde se realizó la incubación de peróxido de hidrógeno, para la inducción de tolerancia a criogenia, en yemas de papa y su relación con las enzimas antioxidantes (la CAT y la POX) y contenidos de peróxido de hidrógeno y prolina.

Plantas de *Solanum tuberosum* L. de los clones 981818 y 06-27 provenientes de incubaciones en 5 y 10 mM de peróxido de hidrógeno mostraron una disminución en las variables de crecimiento, como altura de la planta, longitud de la raíz y peso fresco (Fig. 19, 20, 21). Mora Herrera y López-Delgado (2006), reportan que microplantas de papa incubadas en concentraciones de 0.1–50 mM no mostraron inhibición en el crecimiento de tallos y raíces. El peróxido de hidrógeno bajo condiciones de estrés y no estrés muestra localizaciones específicas en los tejidos, generalmente se asocia con los tejidos vasculares como las nervaduras de las hojas (Beltrán *et al.*, 2018) y se localiza en mayor concentración en la parte foliar, ya que este se genera de forma normal durante la fotosíntesis. El peróxido de hidrógeno reacciona con facilidad con biomoléculas, regula los patrones de expresión en los procesos de ciclos celulares (Slesak *et al.*, 2007). La longitud de la raíz en ambos clones de papa particularmente se inhibió en presencia de H₂O₂ (Fig. 20), Xiong *et al.*, (2015) reportaron que la aplicación exógena de H₂O₂ induce una inhibición en la elongación de raíces, pero incrementa la expansión celular y el diámetro de las raíces. Vanderauwera *et al.*, (2005) reportan evidencia de la relación existente entre el peróxido de hidrógeno y la acumulación de reguladores del crecimiento en plantas. Un incremento en los niveles de auxinas, disparan la acumulación de H₂O₂ resultando en una reducción de la elongación y crecimiento de las raíces. Plantas de papa de clon 06-27 incubadas en presencia de H₂O₂ en la concentración de 10 mM mostraron una disminución del número de entrenudos (Fig.22) así como en las demás variables (Fig.19, 20, 21). Una adecuada elección del material vegetal antes de someterse a criogenia es fundamental para el éxito del protocolo criogénico por lo cual se eligieron las siguientes concentraciones 1 y 5 mM para ser evaluadas en las siguientes fases experimentales.

8.7 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en la supervivencia en *Solanum tuberosum* L. antes de someterse a criogenia

Medios adicionados con antioxidantes en la fase de precultivo pueden incrementar la regeneración a la exposición a temperaturas ultrabajas (Benson *et al.*, 1995). En este trabajo se encontró que la aplicación de AS (Fig. 1, 2, 3, 4) y concentraciones de H₂O₂ (Fig. 19, 20, 21,22) inducen una reducción en parámetros de crecimiento. Este contraste nos permite observar los efectos del H₂O₂ en explantes de papa de los clones 981818 y como las concentraciones podrían estar implicadas en los procesos enzimáticos y contenidos de peróxido de hidrógeno, como evaluación del explante vegetal antes de criogenia, para poder correlacionarlo con la supervivencia obtenida.

Este trabajo comprueba que efectivamente la aplicación de peróxido de hidrógeno en la fase previa incrementa los niveles de supervivencia (Fig. 28) como se obtuvo en los resultados de AS (Fig. 10), posiblemente con mecanismos similares entre los tratamientos de AS y H₂O₂ en la concentración 1 mM, donde se observaron similitudes entre el contenido de peróxido de hidrógeno previo a criogenia (Fig. 7, 25), conduciendo a una posible inducción del sistema antioxidante , ya que en la fase final se obtuvo un incremento en AS y H₂O₂ en la actividad enzimática de la CAT (Fig. 12, 30), la POX (Fig. 14, 32) y contenidos de H₂O₂ (Fig. 16 ,34) y Prolina (Fig. 18, 36), resultado finalmente en un incremento en la supervivencia con ambas moléculas.

Actualmente se desconocen los mecanismos exactos que nos permiten relacionar directamente a la supervivencia de forma lineal, por lo tanto, podemos deducir que la supervivencia es el resultado de la inducción de un conjunto de mecanismos que ayudaran a que las células vegetales, soporten el estrés generado en las fases criogénicas. Algunos puntos clave dentro de la criogenia son la deshidratación, el congelamiento y descongelamiento (Benson, 2008). Cada uno genera diferentes condiciones de estrés abiótico, en criogenia se ha monitoreado la relación entre la producción de EROS y la actividad del sistema antioxidante, dando como resultado cambios es los porcentajes de supervivencia (Zhang *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2011; Rahmad *et al.*, 2015; Danova *et al.*, 2012).

En papa la aplicación exógena de H₂O₂ ha sido utilizada con la finalidad de minimizar daños causados por estrés biótico y abiótico (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016; López Delgado *et al.*,

1998; 2004; 2018) especialmente en frío y congelamiento (Mora-Herrera et al., 2005, Mora-Herrera y López-Delgado 2006; López-Delgado et al., 2018).

El efecto de las aplicaciones exógenas de las concentraciones de H₂O₂, 1 y 5mM, se abordan a continuación en cada una de las fases y se proponen cuales podrían ser los posibles mecanismos que se pueden ir disparando en cada una de las fases analizadas, adicionalmente que se aborda la relación del peróxido de hidrógeno en cada variable y como estos factores afectarán los porcentajes de supervivencia (Fig.28).

De manera general podemos abordar lo siguiente, pretratamiento de H₂O₂ en las concentraciones de 1 y 5 mM muestran inducir tolerancia a criogenia, al causar cambios en el sistema antioxidante en la CAT y la POX (Fig. 23, 24, 29, 30, 31, 32), producción de osmolitos (Fig. 26, 35, 36) y contenido de peróxido de hidrógeno (Fig. 25, 33, 34), durante la fase de precultivo y regeneración de criogenia. Por otra parte, en la fase de deshidratación se mostró que aplicaciones de H₂O₂ tienden a aumentar el potencial hídrico, manteniéndolo en un rango que va desde -18 a -20 MPa (Fig.27), al igual que se encontró en los experimentos de AS (Fig. 9). La suma de todos los factores analizados en la presente investigación determina que el peróxido de hidrógeno es un inductor de tolerancia al estrés en criogenia al aumentar los porcentajes de supervivencia (Fig. 28).

8.8 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en la actividad enzimática de la CAT y de la POX, contenido de peróxido de hidrógeno y prolina en *Solanum tuberosum* L. antes de someterse a criogenia

Un aumento indirecto de la producción de EROS se realiza en la criogenia al someter explantes vegetales a condiciones de aclimatización ó en medios osmótico-adicionados con manitol, sorbitol y altas concentraciones de azúcares. El H₂O₂ es la especie reactiva de oxígeno con menor reactividad, siendo una molécula relacionada con diversos procesos fisiológicos en las plantas al poder penetrar la membrana celular y funcionando como una molécula señalizadora (Noctor *et al.*, 2014). En este trabajo se observó que plantas de *Solanum tuberosum* L. provenientes de los tratamientos de 1 y 5 mM de H₂O₂ del clon 981818 incrementarán los niveles de actividad de la CAT (Fig. 23) y al mismo tiempo se incrementarán los niveles de contenido de H₂O₂ respecto

a los controles correspondientes (Fig. 25). De acuerdo a la literatura la actividad de la CAT está relacionada directamente con los niveles de peróxido de hidrógeno, por mecanismos antes descritos como es el ciclo de autoamplificación de AS/H₂O₂, donde el AS inhibe la actividad de la catalasa y aumenta los niveles de H₂O₂, sin embargo no es una regla estricta y se puede inducir un aumento de ambos o ningún cambio, como por ejemplo en *Agapanthus praecox* donde se observó que en la fase de precultivo la actividad de la CAT, no mostro cambios respecto al control mientras que se incrementó el contenido de H₂O₂, mostrando porcentajes de un 41.9 % de viabilidad (Zhang *et al.*, 2015). Especialmente plantas provenientes del pretratamiento de 1 mM de peróxido de hidrógeno mostraron un incremento en la actividad enzimática de la CAT (Fig. 23) y POX (Fig. 24), al igual que se incrementó el nivel de H₂O₂ (Fig. 25), por lo que podríamos especular que el aumento en los niveles de H₂O₂ se debe a un incremento de la actividad de la SOD. En criogenia se ha observado que un incremento en la actividad de la CAT indica una alta actividad de la SOD en las fases de criopreservación (Poobathy *et al.*, 2013). Zhang *et al.*, (2015) observaron que plantas tolerantes al estrés mostraban una mayor actividad enzimática antioxidante de la CAT, la POX, la SOD y la GR. Lo cual podría ser un factor clave en los porcentajes superiores de supervivencia en esta concentración (Fig. 28), estudios comparativos entre *Solanum* y *Ribes* se encontró que existe un amplio rango de factores que determinan la supervivencia del explante y un punto importante es el genotipo y las condiciones de cultivo (Harding *et al.*, 2009).

Por otra parte, microesquejes de *Solanum tuberosum* L. pretratados con 1 y 5 mM de H₂O₂ mostraron una disminución de la actividad de CAT (Fig. 23) y un aumento en la actividad de POX (Fig. 24). El contenido de H₂O₂ no se alteró significativamente en yemas del clon 06-27 pretratadas con 1 mM, mientras que en la concentración de 5 mM se mostró un aumento del contenido de peróxido del 44.5 % respecto al control (Fig. 25), ambos pretratamientos de H₂O₂ mostraron una inducción de tolerancia al estrés en criogenia (Fig. 28). Interesantemente en este clon se muestra la inducción de señalización dosis dependiente. Un posible incremento en el contenido de peróxido de hidrógeno se originó con la reducción de la actividad de CAT (Fig. 23), lo cual a su vez resulto en la actividad de otras enzimas antioxidantes como la POX (Fig. 24), para reducir los niveles de H₂O₂ (Fig.25). Černý *et al.*, (2018) menciona que las enzimas peroxidasas (POX) son la familia de enzimas más abundantes en la eliminación de la sobreproducción de H₂O₂, participando en la

detoxificación del peróxido de hidrógeno través de la vía de oxidación de compuestos fenólicos, pero también contribuyen a su aumento a través del estrés oxidativo.

Es importante destacar que yemas provenientes de tratamientos de peróxido de hidrógeno, no mostraron inducir una señalización para la producción y acumulación de prolina (Fig. 26) como se observó en los microesequejes del tratamiento de AS (Fig. 8). Esto podría explicarse porque el ácido salicílico está directamente implicado en la expresión de genes de producción de este osmolito (Gusta y Wisniewski 2013; Luo *et al.*, 2014). La aplicación exógena de moléculas como los EROS, en específico el peróxido de hidrógeno ha sido pobremente explorado como inductor de señalización en criogenia, aunque existen múltiples reportes donde se resalta su importancia dentro de los pasos de la criogenia y su impacto en altas concentraciones (Lynch *et al.*, 2011; Georgieva *et al.*, 2014; Vianna *et al.*, 2019) y monitoreando su actividad durante el proceso criogénico en diversas especies, para evaluar los puntos claves, para la mejora de protocolos criogénicos como se ha realizado en especies de *Hypericum*, protocormos de *Dendrobium*, ápices de *Brassidium*, embriones somáticos de olivo y callos embriogénicos de *Agapantus praecox* (Zhang *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2011; Rahmad *et al.*, 2015; Danova *et al.*, 2012).

Li *et al.*, (2018) evaluaron la adición directa de H₂O₂ en las concentraciones de 0, 2, 4 y 8 μmol L⁻¹ en cada paso de la criogenia y su efecto en la actividad de la CAT, contenido de MDA, contenido de H₂O₂, supervivencia y regeneración en semillas de *Celosia plumose*. Donde encontraron que la aplicación exógena de 8 μmol L⁻¹ de peróxido de hidrógeno, en la fase de carga del protocolo de PVS2-vitrificación mostro ser el mejor tratamiento con resultados de un 77.08 % de supervivencia e incrementando la actividad de la CAT y esta actividad se mantuvo en las fases posteriores. Interesantemente los porcentajes obtenidos en esta investigación demuestran un efecto de inducción de tolerancia en criogenia con el uso de pretratamientos de peróxido de hidrógeno en *Solanum tuberosum* L. (Fig.28).

8.9 Efecto del pretratamiento de peróxido de hidrógeno en el potencial hídrico en *Solanum tuberosum* L. antes de someterse a criogenia

Una reducción del contenido del agua en los tejidos sometidos a criogenia es necesario en la fase de deshidratación, con el uso de crioprotectantes que reducen los daños, causados por la formación de cristales de hielo (Volk y Walter, 2006). Guler y Pehlivan (2016) sugieren que pretratamientos con bajas dosis de H_2O_2 disminuyen la pérdida de agua y también se reporta que el contenido de H_2O_2 incrementa la tolerancia a la sequía con una inducción del sistema antioxidante en soya *Glycine max* L. En el presente trabajo se determinó el potencial hídrico (Ψ_A) en los tejidos encapsulados de papa, en el punto de deshidratación justo antes de entrar en contacto con nitrógeno líquido, para poder establecer si la adición de moléculas señalizadoras como AS o H_2O_2 inducen algún cambio.

Percy *et al.*, (2001) encontraron que valores Ψ_A en un rango de -15 y -20 MPa en la fase de deshidratación, aumentan significativamente los porcentajes de supervivencia en la criogenia de especies como *Picea glauca*. En este trabajo plantas de *Solanum tuberosum* de los clones 981818 y 06-27 provenientes de los tratamientos de H_2O_2 mostraron un aumento del potencial hídrico en ambos tratamientos (Fig. 27). Los valores encontrados en la presente investigación mostraron que yemas del clon 981818 provenientes del tratamiento control presentaron un potencial de -25.13 MPa (Fig. 27), por otra parte, yemas del clon 06-27 provenientes del control mostraron un potencial de -20.76 MPa (Fig. 27). Valores similares se encontraron en yemas provenientes del tratamiento control en los experimentos de AS (Fig.9). Una respuesta propia del genotipo y su posible deshidratación excesiva se puede observar contrastando los valores obtenidos en las mismas condiciones entre los controles de los clones 981818 y 06-27 en los experimentos de AS y H_2O_2 (Fig.9, 27). Yemas del tratamiento control del clon 981818 muestran valores más bajos de potencial hídrico (Fig. 9, 27) y fuera de los límites reportados por Percy *et al.*, (2001) y los porcentajes de supervivencia en papa observados son de entre un 8.33-11.11 % (Fig.10). En esta etapa de deshidratación se ha reportado, que existe una acumulación de H_2O_2 , que se dispara significativamente como se reporta en *Agapanthus praecox*, influyendo en los porcentajes de supervivencia posteriores (Zhang *et al.*, 2015). En papa la incubación de 1h en las concentraciones de 1 y 5 mM de peróxido de hidrógeno en la fase de precultivo, inducen respuestas fisiológicas ante condiciones de estrés. La aplicación de H_2O_2 induce termotolerancia durante termoterapia en microplantas de *Solanum tuberosum* L., tolerancia a frío o congelamiento y también a estrés osmótico en condiciones de sequía (Martinez-Gutiérrez *et al.*, 2012). Los métodos criogénicos

utilizados en papa se optimizan utilizando variaciones en los tiempos que permanecen los tejidos en las diferentes etapas (deshidratación), por lo cual establecer el rango óptimo de Ψ_A en la fase de deshidratación, puede darnos un indicio del éxito en la supervivencia.

El uso de moléculas como el H_2O_2 , como pretratamientos en la fase de precultivo indican que pueden ser inductores de tolerancia a la deshidratación en criogenia, activándose mecanismos aun no reportados. Aunque se conoce que el peróxido de hidrógeno participa en mecanismos de tolerancia a estrés osmótico, incrementando los metabolitos en *Zea Mays* (Terzi *et al.*, 2014), inducción de la producción de antioxidantes en déficit hídrico (Ashraf *et al.*, 2015) y protegiendo ultraestructuras de las células del mesófilo, mejorando la fotosíntesis y disminuyendo los efectos negativos en sequía en *Tagetes erecta* (Liao *et al.*, 2012).

8.10 Efecto del pretratamiento de ácido salicílico en *Solanum tuberosum* L. en la actividad enzimática de la CAT y la POX, contenidos de peróxido y prolina en dos tiempos de regeneración después de criogenia (12 y 72 h de regeneración)

López-Delgado *et al.*, (2018) reportaron que la incubación de la concentración de 1 mM de peróxido de hidrógeno en la fase previa a la exposición a un estrés térmico resulto en la inducción de tolerancia a temperaturas de congelamiento, aumentando con ello los porcentajes de supervivencia. Zhang *et al.*, (2015) reportan que la acumulación de EROS en la fase de regeneración está relacionada con los posibles niveles de expresiones de genes de la SOD y la CAT. Yemas de los clones 981818 y 06-27, sometidas a criogenia y en medio de regeneración por 12 h mostraron patrones diferentes no solo entre cada genotipos, sino también en la inducción de cambios en las variables de actividad enzimática de la CAT, la POX, y contenidos de H_2O_2 y prolina (Fig. 29, 31, 33, 35). Posteriormente al transcurrir las 72 h en la fase de regeneración, se observó que los niveles enzimáticos de la CAT y la POX se incrementaron (Fig. 30, 32) y la incubación en las concentraciones de 1 y 5 mM pueden ser concentraciones con actividad biológica en criogenia, al aumentar los porcentajes de supervivencia (Fig. 28). Un aumento de los porcentajes de supervivencia (Fig.28) en plantas provenientes de ambos clones pretratados con 5 mM de H_2O_2 a las 72 h muestran diferencias entre las variables de contenido de peróxido de

hidrógeno y prolina (Fig. 34, 36) que se abordaran más a fondo a continuación hipotetizando cada una de las variables involucradas.

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes del tratamiento del 1mM, en la fase de regeneración a las 12 h mostraron actividades enzimáticas de la CAT, y la POX sin diferencias significativas respecto al control (Fig. 29, 31). Algunas especies donde se monitorea la actividad enzimática especialmente de la CAT en criogenia, muestran que en las primeras horas de regeneración puede existir una disminución como se reporta en la criogenia de ápices de *Passiflora Suberosa* (Vianna *et al.*, 2019), un aumento como en especies de *Hypericum* (Georgieva *et al.*, 2014) o en algunas especies no existen cambios como en *Celosia plumosa* (Li *et al.*, 2018), efectos dependientes de múltiples variables como lo son la especie vegetal, precultivo, agentes osmóticos, condiciones de regeneración, entre otros. Similarmente no se observaron cambios en el contenido de peróxido de hidrógeno, esto podría explicarse de la siguiente manera. Un análisis completo desde la fase de precultivo mostró que en yemas del clon 981818, los niveles de H₂O₂ eran mayores (Fig. 25), al igual que la actividad enzimática (Fig. 23, 24) y el contenido de prolina no mostro diferencias significativas (Fig. 26), una posible señalización inducida por el H₂O₂ en las fases siguientes como la deshidratación, pudo inducir una acumulación de azúcares o la señalización para la síntesis de osmolitos como prolina; lo anterior también es relacionado con la tolerancia que se presentó en la fase de deshidratación. Investigaciones previas han demostrado que el H₂O₂ incrementa el contenido de azúcares totales en sequía. Ishibashi *et al.*, (2011) proponen que tratamientos con H₂O₂ resultan en un ajuste osmótico con la vía de acumulación de solutos compatibles y no tóxicos en altas concentraciones. Existe evidencia de que la aplicación exógena de H₂O₂ incrementan el contenido de azúcares solubles, prolina, poliaminas y decrecen los niveles de MDA en condiciones de sequía (Saleem *et al.*, 2020). Mismos efectos que se mantienen a las 72 h, presentando una actividad enzimática mayor de la CAT y la POX (Fig. 30, 32) respecto al control y sin un incremento significativo del peróxido de hidrógeno (Fig. 34) pero con un incremento en los porcentajes de supervivencia (Fig. 28) Por lo tanto podemos concluir que la aplicación exógena de 1 mM de peróxido de hidrógeno en el clon 981818 induce tolerancia a criogenia y aumenta los porcentajes de supervivencia (Fig. 28).

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 981818 provenientes del tratamiento de peróxido de hidrógeno 5 mM, en la fase de regeneración a las 12 h mostraron un incremento significativo en la actividad de las variables enzimáticas (CAT, POX; Fig. 29, 31), un aumento en el contenido de prolina (Fig. 35) y una disminución del contenido de peróxido de hidrógeno respecto al control en cada variable (Fig. 33). Un aumento en la actividad enzimática en las primeras horas de regeneración se ha reportado que minimizan los daños inducidos en criogenia (Rahmah *et al.*, 2015; Danova *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2019) y conduce a un aumento en los porcentajes de supervivencia. En el presente trabajo se observó que el incremento de la actividad enzimática de la CAT y la POX permanece en los dos estadios de muestreo (Fig. 29, 30, 31, 32), aplicaciones exógenas de la CAT en la fase de regeneración han mostrado que inducen una reducción significativa del contenido de H₂O₂ y reducen la expresión de la proteasa Caspasa-3 relacionada con la expresión de genes de muerte celular programada (Jiang *et al.*, 2019). Las peroxidasas como la APX y la POX han demostrado tener un efecto importante dentro de los procesos criogénicos, siendo mayormente estudiada la APX por su relación dentro del ciclo del AsA-GHS. Adicionalmente en la criopreservación de *Agapanthus praecox* la actividad de la POX no muestra un patrón en las diferentes etapas del protocolo con cambios significativos entre estos (Jiang *et al.*, 2019). Yemas de papa del clon 981818 provenientes del tratamiento 5 mM de H₂O₂ en la fase de regeneración mostraron cambios en el contenido peróxido de hidrógeno a las 12 h, donde se observó una disminución significativa respecto al control (Fig. 33) probablemente producto de la alta actividad enzimática (Fig. 29, 31); pero a las 72 h mostro un incremento significativo respecto al control.(Fig. 34), pero en contraste con el contenido de peróxido de hidrógeno en la fase de precultivo mostro ser menor en este tratamiento, lo cual podría ser producto de una producción de fenoles causado por MDA en alguna fase de la regeneración. El incremento en el contenido de peróxido de hidrógeno podría reflejarse con la ligera baja de la supervivencia contrastando los porcentajes de supervivencia obtenidos entre las plantas del clon 981818 en el tratamiento de 5 mM (29.16 %) y 1 mM (36.11 %) (Fig.28). Posiblemente este sea un efecto dosis-dependiente, como menciona Mora-Herrera y López-Delgado (2006), donde observaron que en cultivares de papa existe un efecto dosis dependiente de H₂O₂ en la supervivencia en la concentración de 5 mM en el cultivar más sensible.

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes del tratamiento de la concentración 1 mM de H₂O₂, en la fase de regeneración a las 12 h mostraron una actividad de las variables enzimáticas (CAT, POX) sin diferencias significativas respecto al control (Fig. 29, 31) Un aumento en la actividad de ambas enzimas a las 72 h de regeneración de igual forma que se mostró en el clon 981818 (Fig. 30, 32), lo cual indica una misma respuesta fisiológica independiente del clon. El peróxido de hidrógeno tiene efectos positivos, ya que se activan genes relacionados a tolerancia en plantas bajo estrés, los cuales codifican para enzimas antioxidantes que tienen un papel importante en el control de la sobreproducción y acumulación de las EROS, manteniendo el balance redox en la célula (Hossain *et al.*, 2015).

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes del tratamiento de peróxido de hidrógeno en la concentración de 1 mM, en la fase de regeneración a las 12 h y a las 72 h mostraron una disminución del contenido de peróxido (Fig. 33, 34), evidentemente producto de la alta actividad enzimática en ambos puntos de la regeneración (Fig. 29, 30, 31, 32), adicionalmente se observó que aun en la fase de regeneración se incrementó la síntesis y acumulación de prolina (Fig. 35, 36). Existen reportes de los efectos exógenos del peróxido de hidrógeno, donde raíces de tomate pretratadas con una solución de H₂O₂ 1mmol⁻¹ tuvo un efecto en el contenido relativo de agua bajo periodos cortos de frío, adicionalmente plantas pretratadas con peróxido de hidrógeno mostraron mayor acumulación de contenido de prolina en las raíces y una mayor actividad de la APX y la CAT (Iseri *et al.*, 2013).

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes del tratamiento de la concentración 5 mM de H₂O₂, en la fase de regeneración a las 12 h mostraron un incremento significativo en la actividad de la CAT (Fig. 29), la actividad de la POX no tuvo diferencias significativas (Fig. 31), pero a las 72 h ambas enzimas mostraron un incremento de su actividad (Fig. 30, 32). Es importante mencionar que, aunque la actividad de la POX no se incrementó a las 12 h (Fig. 31), puede existir la posibilidad de que otras enzimas implícitas en el mecanismo de eliminación de EROS este promoviendo la disminución del peróxido de hidrógeno como lo es la enzima APX; la cual ha sido reportada en criogenia y que regularmente se incrementa en las fases de regeneración (Zhang *et al.*, 2015; Klapheck *et al.*, 1990).

Yemas de *Solanum tuberosum* L. del clon 06-27 provenientes del tratamiento de la concentración 5 mM de H₂O₂, en la fase de regeneración mostraron una disminución en el contenido de peróxido de hidrógeno a las 12 y 72 h de regeneración efecto similar al observado en el clon 981818 (Fig. 33, 34). Resultado de alta actividad enzimática a las 72 h (Fig. 30, 32). La actividad de la catalasa y de la ascorbato peroxidasa son parte importante del sistema antioxidante como la POX. La expresión de proteínas también se cree que es una respuesta fisiológica contra el estrés osmótico y puede conducir a los mecanismos de tolerancia a congelamiento (Jitsuyama *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). El peróxido de hidrógeno tiene efectos positivos, ya que promueve la activación de genes relacionados a tolerancia en plantas bajo estrés (Hossain *et al.*, 2015). Genes que codifican para enzimas antioxidantes que tienen un papel importante en el control de la sobreproducción y acumulación de EROS y manteniendo el balance redox en la célula (Hossain *et al.*, 2015). Ellouzi *et al.*, (2017) notaron que pretratamientos de peróxido de hidrógeno tienen la habilidad de disminuir los niveles endógenos de peróxido de hidrógeno seguido de un incremento en la actividad antioxidante. Mecanismos anteriormente mencionados podrían estar presentes aumentando así la supervivencia a criogenia e inducción de tolerancia (Fig. 28).

9. CONCLUSIONES

- ❖ En este estudio se demostró el efecto de moléculas señal AS y el H₂O₂ en la inducción de tolerancia al estrés en criogenia al aumentar los porcentajes de supervivencia en plantas de los clones 981818 y 06-27 de *Solanum tuberosum* L., mediado por cambios enzimáticos de la CAT y la POX, contenido de peróxido de hidrógeno, prolina y potencial hídrico en la fase de deshidratación.
- ❖ Tratamientos de AS y H₂O₂ inducen una respuesta similar después de criogenia a las 72 h de regeneración, con un aumento en la actividad enzimática de la catalasa y la peroxidasa, así como una reducción del contenido de peróxido de hidrógeno.
- ❖ La presencia de AS como tratamiento en la fase previa a criogenia, induce una disminución de la actividad de la CAT, aumenta los niveles de H₂O₂ y la acumulación de prolina proporcionando a las yemas una señalización independiente del genotipo, para reducir los daños causados por el estrés durante criogenia.
- ❖ El tratamiento de incubación en H₂O₂ como tratamiento en la fase previa a criogenia induce mecanismos diferentes en cada concentración, pero que inducen el mismo efecto en la supervivencia.
- ❖ El tratamiento de AS induce una reducción del contenido de peróxido de hidrógeno en la fase de regeneración en los tiempos de 12 y 72 h en ambos clones de papa.
- ❖ La incubación de microplantas de papa en AS induce el mismo patrón de respuesta en el contenido de peróxido de hidrógeno en las etapas previa y posterior a criogenia en los clones 981818 y 06-27.
- ❖ El H₂O₂ induce tolerancia a criogenia por diferentes rutas de señalización dependientes de la dosis y el genotipo.

- ❖ La cuantificación en la fase de deshidratación del potencial hídrico es una metodología aplicable y replicable en *Solanum tuberosum* L.
- ❖ El potencial hídrico en la fase de deshidratación en criogenia en yemas de papa en un rango de -18 a -25 MPa y equivalente a 90 min en sílica gel.
- ❖ Tratamientos de AS inducen para la acumulación del osmolito prolina en ambos clones de papa.
- ❖ La aplicación exógena de la concentración de 1 mM de H₂O₂ en el clon 981818 incremento la actividad enzimática de la CAT y la POX en la fase de precultivo y regeneración a las 72 h.
- ❖ La aplicación exógena de la concentración de 5 mM de H₂O₂ en el clon 981818 disminuyo la actividad de CAT y incremento la actividad de POX en la fase de precultivo y regeneración a las 72 h.
- ❖ La aplicación exógena de la concentración de 5 mM de H₂O₂ en el clon 981818 disminuyo la actividad de la CAT y incremento la actividad de la POX en la fase de precultivo y regeneración a las 72 h.

10. LITERATURA CITADA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105, 121-126.
- Aguilar-Camacho, M., Mora-Herrera, M. E., y López-Delgado, H. A. 2016. Potato virus X (PVX) elimination as short and long term effects of hydrogen peroxide and salicylic acid is differentially mediated by oxidative stress in synergism with thermotherapy. *American Journal of Potato Research*. 93(4), 360-367.
- Ahmad, H., Kamarudin, S. K., Minggu, L. J., y Kassim, M. 2015. Hydrogen from photocatalytic water splitting process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 43, 599-610.
- Anderson, Jeffrey A. 2002. "Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves." *Scientia Horticulturae* 95.4: 277-284.
- Andrade, H., O. Bastidas, and S. Sherwood. 2002. "La papa en el Ecuador In: El Cultivo de la papa en Ecuador." Capitulo 1. In Pumisacho, M., & Sherwood, S. *El cultivo de la papa en Ecuador*. Editorial Abya Yala. INIAPCIP. Quito, Ecuador 21-31.
- Apostol, I., Heinstein, P. F., & Low, P. S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant physiology*. 90(1), 109-116.
- Arfan, M. 2009. Exogenous application of salicylic acid through rooting medium modulates ion accumulation and antioxidant activity in spring wheat under salt stress. *International Journal of Agriculture And Biology*. 11(4), 437-442.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85:235-241.
- Ashraf, M. A., Rasheed, R., Hussain, I., Iqbal, M., Haider, M. Z., Parveen, S., & Sajid, M. A. 2015. Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zea mays* L.) under water-deficit conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(4), 507-523.
- Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*. 59(2), 206-216.

- Avendaño, C. H., Trejo, C., López, C., Molina, J. D., Santacruz, A., Castillo, F. 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia*. 30(9):560–564.
- Ayala-Hernández, D. D., Ruiz-Saénz, D. R., Cruz-Gutiérrez, E. J., y López-Delgado, H. A. 2019. Salicylic acid induces tolerance to cryogenic stress in *Solanum tuberosum*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 10(7), 1505-1515.
- Azcón-Bieto, J., Talón M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2da Edición. McGraw-Hill Interamericana de España. Universidad de Barcelona, 651p.
- Azevedo-Neto A. D., Gomes Filho E, Prisco JT. 2008. Salinity and oxidative Stress. In: Khan NA, Singh S (eds.) *Abiotic stress and plant responses*. IK International, New Delhi, pp. 58-82.
- Azevedo-Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Medeiros, J.R., Gomes Filho, E. 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology*. 162:1114-1122.
- Baek, K. H., & Skinner, D. Z. 2012. Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants.
- Bajaj, K. L., & Devsharma, A. K. 1977. A colorimetric method for the determination of tannins in tea. *Microchimica Acta*. 68(3), 249-253.
- Barandalla, L., Sánchez, I., Ritter, E., & Ruiz de Galarreta, J. I. 2003. Conservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars by cryopreservation. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(4), 9-13.
- Barnett, N. M., & Naylor, A. W. 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*. 41(7), 1222-1230.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*. 39(1), 205-207.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 195(1), 133-140.
- Beltrán, J., Wamboldt, Y., Sanchez, R., LaBrant, E. W., Kundariya, H., Viridi, K. S., & Mackenzie, S. A. 2018. Specialized plastids trigger tissue-specific signaling for systemic stress response in plants. *Plant physiology*. 178(2), 672-683.

- Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Fuentes-Lara LO. 2009. Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. En: A. Benavides-Mendoza (Compilador). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México. Temas Modernos de Nutrición Vegetal, A.C., pp. 13-26.
- Benson, E. E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in Plant sciences*. 27(3), 141-219.
- Benson, E. E., Harding, K., & Smith, H. 1989. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre-and post-freeze light regimes. *Cryo letters*. 10(5) ,323-344.
- Benson, E. E., Lynch, P. T., & Jones, J. 1995. The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Science*, 110(2), 249-258.
- Bernard, F., Shaker-Bazarnov H., Kaviani B. 2002. Effects of salicylic acid on cold preservation and cryopreservation of encapsulated embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.). *Euphytica* 123. (1):85-88.
- Bezrukova, M.V, R. Sakhabutdinova, R A. Fatkhutdinova, I. Kyldiarova and F. Shakirova. 2001. The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. *Agrochemiya* (Russ). 2:51–54.
- Bieto, J. A., and Manuel Talón. 2013. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Publicaciones y Ediciones Universidad de Barcelona.
- Bonnemain, J. L., Chollet, J. F., & Rocher, F. 2013. Transport of salicylic acid and related compounds. Springer, Dordrecht. In *Salicylic acid* , 43-59.
- Bouafia, S., Jelti, N., Lairy, G., Blanc, A., Bonnel, E., & Dereuddre, J. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation dehydration. *Potato Research*. 39(1), 69-78.
- Bourbouloux, A., Raymond, P., & Delrot, S. 1998. Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. *Journal of Experimental Botany*. 49(319), 239-427.
- Boyer, J. S., Cavalieri, A. J., & Schulze, E. D. (1985). Control of the rate of cell enlargement: excision, wall relaxation, and growth-induced water potentials. *Planta*. 163(4). 527-543.
- Brugière, N., Jiao, S., Hantke, S., Zinselmeier, C., Roessler, J. A., Niu, X., & Habben, J. E. 2003. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology*. 132(3), 1228-1240.

- Burdon, R. H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(4), 775-794.
- Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Černý, M., Habánová, H., Berka, M., Luklová, M., & Brzobohatý, B. 2018. Hydrogen peroxide: its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(9). 2812.
- Chance B, Maehly AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic 764-5.
- Che, Y., Zhang, N., Zhu, X., Li, S., Wang, S., & Si, H. 2020. Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Scientia Horticulturae*, 261, 108949.
- Chen, G., L. Ren, J. Zhang, B. M. Reed, D. Zhang and X. Shen. 2015. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. *Cryobiology* 70: 38–47.
- Corlett, R. T. 2017. A bigger toolbox: biotechnology in biodiversity conservation. *Trends in biotechnology*, 35(1), 55-65.
- Coutiño-Magdaleno, A., González-Hernández, V. A., Ramírez-Ramírez, I., Rodríguez-Mendoza, M., & Soto-Hernández, R. M. 2018. Compuestos endógenos con efecto regulador de la brotación de estolones en *Solanum tuberosum* L. *Agrociencia*. 52(1), 77-89.
- Danova, K., Nikolova-Damianova, B., Denev, R., & Markovska, Y. 2012. Impact of pre-culture on short-and long-term in vitro recovery of the biosynthetic potential and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense of *Hypericum rumeliacum* Boiss after cryostorage. *Plant Growth Regulation*. 68(3), 447-457.
- Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foyer C. H. and Scott I. M. 1998 Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermo-tolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol*. 116: 1351–1357.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E. V. M. M., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*,. 57(5), 779-795.

- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. 2016. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Ellouzi, H., Sghayar, S., and Abdelly, C. 2017. H₂O₂ seed priming improves tolerance to salinity; drought and their combined effect more than mannitol in *Cakile maritima* when compared to *Eutrema salsugineum*. *Journal of Plant Physiology*. 210: 38–50.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Proceedings of an international workshop, Tsukuba, Japan, October, 1998 (pp. 8-20). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Engelmann, F. (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 40(5), 427-433.
- Engelmann, F., & Engels, J. M. M. 2002. Chapter 9: Technologies and strategies for *ex situ* conservation. *Managing plant genetic diversity*. 89-103.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia horticulturae*, 113(2), 120-128.
- Escudero, D. M., Sánchez, P. A. G., & Montoya, M. M. 2016. Detección y caracterización molecular del Potato virus Y (PVY) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 31(1).
- Espinoza, N.O., Estrada, R., Silva-Rodriguez, D., Tovar P., Lizarraga R., Dodds, J. H. 1985. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture*. 15, 21–6.
- Fabre, J., & Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo Letters*.
- Faccioli, G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In *Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Springer, Dordrecht. 365-390.
- FAOSTAT.2021. Dirección de Estadística. En: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> consulta julio de 2021.
- Farooq, M., Wahid, A., & Lee, D. J. 2009. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31(5), 937-945.

- Fernández, J. M. E., & Gutiérrez, J. G. 2012. Estado de los recursos fitogenéticos desde la perspectiva de las redes de semillas. *Agroecología*. 7(2), 47-63.
- Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and nonstomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. 89(2), 183-189.
- Foyer, C.H. and Lelandis, M. 1993. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In *Photosynthetic Responses to the Environment* (ed. H.Y. Yamamoto). America Society of Plant Physiologists. Rockville. pp 88-101.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28:1056-1071.
- Foyer CH, Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*. 100:241-254.
- Foyer, C. H., Harbinson, J., & Mullineaux, P. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, 1-42.
- Fragnière, C., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Métraux, J. P., & L'Haridon, F. 2011. Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. *FEBS letters*, 585(12), 1847-1852.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Ralls, K., Eldridge, M., Dudash, M. R., Fenster, C. B., & Sunnucks, P. 2017. Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press.
- Fryer, M. J., Andrews, J. R., Oxborough, K., Blowers, D. A., & Baker, N. R. 1998. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant physiology*. 116(2), 571-580.
- García-Aguilar, L., Feria, M. & Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*. 7 (2): 67 - 79.
- Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V., & Minkov, I. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*. 160(5), 509-515.

- Georgieva, E., Petrova, D., Yordanova, Z., Kapchina-Toteva, V., Cellarova, E., & Chaneva, G. 2014. Influence of cryopreservation on the antioxidative activity of in vitro cultivated *Hypericum* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 28(5), 863-870.
- Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48:909-930.
- Golmirzaie, A.M., Panta, A. 2000. Advances in potato cryopreservation at CIP. In: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba. pp 250–254
- Golmirzaie, A. M., Panta, A., & Toledo, J. 1999. Biotechnological advances in the conservation of root and tuber crops. *Plant Conservation Biotechnology*. 165-178.
- Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Costa, J. H., Alencar, N. L. M., Prisco, J. T. 2012. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. *Plant Physiology and Biochemistry*. 56:62-71.
- Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Lacerda, C. F., Prisco, J. T., Azevedo Neto, A. D., & Marques, E. C. 2010. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds: effects on germination and seedling acclimation to salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2), 103-112.
- Gondim, F. A., Miranda, R. D. S., Gomes-Filho, E., & Prisco, J. T. (2013). Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H₂O₂ leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 25(4), 251-260.
- Gong, M., B. Chen., Z. G., Li, L., & Guo. H. 2001. Heat–shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedling and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology*. 158(9). 1125-1130.
- González-Benito, M. E., I. Clavero Ramírez, and José Manuel López Aranda. (2004). "the use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops." *Spanish Journal of Agricultural Research* 3: 341-352.
- Guler, N. S., & Pehlivan, N. 2016. Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine max* L.) through inducing antioxidant system. *Acta Biologica Hungarica*. 67(2), 169-183.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and

- mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal Plant Physiology*. 164:728-736.
- Gusta, L. V., & Wisniewski, M. 2013. Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiologia plantarum*. 147(1), 4-14.
- Guy, C. L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41,187- 223. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.001155.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141, 312-322.
- Halmagyi, A., Deliu, C., & Coste, A. 2005. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters*, 26(5), 313-322.
- Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T., & Miura, K. 2012. Abiotic stress and role of salicylic acid in plants. *Abiotic stress responses in plants*. 235-251.
- Harding, K., & Benson, E. E. 2001. The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. *in vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. *Cryo letters*. 22(3), 199-208.
- Harding, K., Johnston, J. W., & Benson, E. E. 2009. Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated *in vitro* crop plant germplasm. *Agricultural and Food Science*. 18(2), 103-116.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. Springer, Dordrecht. pp. 261-315.
- Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Ghazvini, R. F., & Sohani, M. M. 2014. The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*. 61(4), 443-450.
- Havir, E. A. 1992. The *in vivo* and *in vitro* inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana sylTestris* by 3-amino-1,2,4- triazole. *Plant Physiology*. 99: 533 – 537.
- Havir, E. A. and McHale, N. A. 1989. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiology*. 91: 812 – 815.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, 60(4), 579-598.

- Henshaw, G. G., O'Hara, J. F., & Stamp, J. A. (1985). Cryopreservation of potato meristems. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. 159-170.
- Hirai, D., & Sakai, A. 1999 . Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research*, 42(1), 153-160.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., & Tran, L. S. P. 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in plant science*. 6, 420.
- Hsu, Y. H., Annamalai, P., Lin, C. S., Chen, Y. Y., Chang, W. C., & Lin, N. S. 2000. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem-tip cultures. *Plant Pathology*. 49(1), 101-107.
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N., & Titov, A. 2019. Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*. 41(6), 1-10.
- Iqbal, N., Umar, S., & Khan, N. A. 2015. Nitrogen availability regulates proline and ethylene production and alleviates salinity stress in mustard (*Brassica juncea*). *Journal of Plant Physiology*. 178, 84-91.
- İşeri, Ö. D., Körpe, D. A., Sahin, F. I., & Haberal, M. 2013. Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35(6), 1905-1913.
- Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., & Zheng, S. H. 2011. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*. 168(13), 1562-1567.
- Iyer, S., & Caplan, A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiology*. 116(1), 203-211.
- Janda, M., & Ruelland, E. 2015. Magical mystery tour: salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany*. 114, 117-128.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., & Páldi, E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, 164(2), 301-306.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., & Páldi, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208(2), 175-180.

- Jansen, M., Elfstrand, M., Heggie, L., Sitbon, F., Dix, P., & Thorneley, R. 2004. Over-expression of phenol-oxidising peroxidases alters the UV-susceptibility of transgenic *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*. 163:585-594.
- Jia, M., Di, W., Liu, Y., Shi, Y., & Xie, Y. 2016. ROS-induced oxidative stress in nobile-type *Dendrobium* protocorm-like bodies (PLBs) during vitrification. *Cryoleters*. 37(4), 253-263.
- Jiang, M., & Zhang, J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*. 42(11), 1265-1273.
- Jiang, X. R., Ren, R. F., Di, W., Jia, M. X., Liu, Y., & Gao, R. F. 2019. Hydrogen peroxide and nitric oxide are involved in programmed cell death induced by cryopreservation in *Dendrobium* protocorm-like bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 137(3), 553-563.
- Jiménez-Bremont, J. F., Becerra-Flora, A., Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Kessler, M., Acosta-Gallegos, J. A., & Ramírez-Pimentel, J. G. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum*. 50(4), 763-766.
- Jitsuyama, Y., Suzuki, T., Harada, T., & Fujikawa, S. 2002. Sucrose incubation increases freezing tolerance of *Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. *Cryo-Letters*. 23: 103–112.
- Kabir, M. A., Huque, M. M., Islam, M. R., & Bledzki, A. K. 2010. Mechanical Properties Of Jute Fiber Reinforced Polypropylene Composite; Effect Of Chemical Treatment By Benzenediazonium Salt In Alkaline Medium. *BioResources*, 5(3), 1618-1625.
- Kaczmarczyk, A. 2008. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips. Dissertation. Verlag Dr. Köster Berlin, Germany Kaczmarczyk A, Rutten T, Melzer M, Keller ERJ (2008a) Ultrastructural changes associated with cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips. *Cryo-Letters* 29:145–156.
- Kaczmarczyk, A., Grube, M., Keller, E.R.J. 2009. History and development of the potato cryopreservation method and the cryopreserved collection at the IPK Gatersleben, Meeting of the WG2, COST Action 871 ‘Cryopreservation of Crop Species in Europe’. Gatersleben, Germany. 9(09) :37.
- Kaczmarczyk A, Shvachko N, Lupysheva Y, Hajirezaei MR, Keller ERJ. 2008b. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. *Plant Cell Reports*. 27:1551–1558.

- Kaczmarczyk, A., Funnekotter, B., Menon, A., Phang, P. Y., Al-Hanbali, A., Bunn, E., & Mancera, R. 2012. Current issues in plant cryopreservation. In *Current Frontiers in Cryobiology* .417-438.
- Kaczmarczyk, S. J., Sitaraman, K., Young, H. A., Hughes, S. H., & Chatterjee, D. K. 2011. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.108(41), 16998-17003.
- Kang, G., Wang, C., Sun, G., & Wang, Z. 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 50(1), 9-15.
- Kang, H. M., & Saltveit, M. E. 2002. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(3), 513-518.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 284(5414), 654-657.
- Kartha, K. K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. *Cryopreservation of plant cells and organs*, 115-134.
- Khan, M. I. R., Khan, N. A., Masood, A., Per, T. S., & Asgher, M. 2016. Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard. *Frontiers in Plant Science*. 7, 44.
- Khan, T. A., Yusuf, M., & Fariduddin, Q. 2018. Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. *Photosynthetica*. 56(4), 1237-1248.
- Khan, T. A., Yusuf, M., Ahmad, A., Bashir, Z., Saeed, T., Fariduddin, Q. & Wu, T. 2019. Proteomic and physiological assessment of stress sensitive and tolerant variety of tomato treated with brassinosteroids and hydrogen peroxide under low-temperature stress. *Food Chemistry*. 289, 500-511.
- Kim, H. H., Yoon, J. W., Park, Y. E., Cho, E. G., Sohn, J. K., Kim, T. S., & Engelmann, F. (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *Cryo-Letters*, 27(4), 223-234.

- Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., & Verma, D. P. S. 1995. Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108(4), 1387-1394.
- Klapheck, S., Zimmer, I., & Cosse, H. 1990. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 31(7), 1005-1013.
- Kloosterman, B., Abelenda, J. A., Carretero-Gomez, M. M., Oortwijn, M., De-Boer, J. M., Kowitwanich, K., Horvath, B. M., Van-Eck, H. J., Smaczniak, C., Prat S., Visser, R. G. F. y Bachem, C. W. B. 2013. Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature*. 495 (7440), 246-250.
- Kocsy, G., Galiba, G., & Brunold, C., 2001. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*. 113(2), 158-164.
- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A., & Djilianov, D. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant science*. 163(1), 157-164.
- Koskeroglu, S. & Tuna, A. 2010. The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32: 541–549.
- Kryszczuk, A., Keller, J., Grübe, M., & Zimnoch-Guzowska, E. 2006. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. *International Journal of Food, Agriculture and Environment* . 4(2), 196-200.
- Kumar, D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
- Kumar, M., Sirhindi, G., Bhardwaj, R., Kumar, S., & Jain, G. 2010. Effect of exogenous H₂O₂ on antioxidant enzymes of *Brassica juncea* L. seedlings in relation to 24-epibrassinolide under chilling stress.
- Kumar, V., & Yadav, S. K. 2009. Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31(2), 261-269.
- Kushad, M. M., & Yelenosky, G. 1987. Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiology*. 84(3), 692-695.
- Lay, S. L., Simard, G., Martinez, M. C. & Andriantsitohaina, R. 2014. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014, 1-18.

- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and Lamb C. 1994 H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hyper- sensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583–593.
- Li, B. L., Zhang, M., Wang, X. Z., Jiang, X. R., & Liu, Y. 2018. The role of hydrogen peroxide in cryopreservation of cockscomb (*Celosia plumosa*) seedlings. In III International Symposium on Plant Cryopreservation. 1234, 73-78.
- Liang, Y. and W.Q. Sun. 2000. Desiccation tolerance of recalcitrant *Theobroma cacao* embryonic axes: the optimal drying rate and its physiological basis. *Journal of Experimental Botany*. 51:1911–1919.
- Liao, W. B., Huang, G. B., Yu, J. H., & Zhang, M. L. 2012. Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in marigold explants and promote its adventitious root development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 58, 6-15.
- Livingston, N. J., Von Aderkas, P., Fuchs, E. E. A & Reaney, M. J. T. 1992. Water relations parameters of embryogenic cultures and seedlings of larch. *Plant Physiology*. 100:1304–1309.
- Lopez-Delgado H., Dat J. F., Foyer C. H. and Scott I. M. 1998 Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of experimental botany*. 49: 713–720.
- López-Delgado, H. A., Martínez-Gutiérrez, R., Mora-Herrera, M. E., & Torres-Valdés, Y. 2018. Induction of freezing tolerance by the application of hydrogen peroxide and salicylic acid as tuber-dip or canopy spraying in *Solanum tuberosum* L. plants. *Potato Research*, 61(3), 195-206.
- López-Delgado, H., Mora-Herrera, M. E., Zavaleta-Mancera, H. A., Cadena-Hinojosa, M., & Scott, I. M. 2004. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*, 81(3), 171-176.
- Luo, Y. L., Su, Z. L., Bi, T. J., Cui, X. L., & Lan, Q. Y. (2014). Salicylic acid improves chilling tolerance by affecting antioxidant enzymes and osmoregulators in sachu inchi (*Plukenetia volubilis*). *Brazilian Journal of Botany*. 37(3), 357-363.
- Lynch, P. T., Siddika, A., Johnston, J. W., Trigwell, S. M., Mehra, A., Benelli, C., & Benson, E. E. 2011. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science*, 181(1), 47-56.

- Macgayver Bonilla Morales, Miguel, Carolina Mancipe Murillo, and Adriana Carolina Aguirre Morales. 2015. "Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos." *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 6.1
- Mady, M. A. 2009. Effect of foliar application with salicylic acid and vitamin e on growth and productivity of tomato plant (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Journal of Plant Production*. 34(6), 6715-6726.
- Martínez-Gutiérrez, R., Mora-Herrera, M. E., & López-Delgado, H. A. (2012). Exogenous H₂O₂ in phytoplasma-infected potato plants promotes antioxidant activity and tuber production under drought conditions. *American Journal of Potato Research*, 89(1), 53-62.
- Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N. Y., Buchala, A., & Serrano, M. 2019. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, 10, 423.
- Mathew, L., McLachlan, A., Jibrán, R., Burritt, D. J., & Pathirana, R. 2018. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. *Protoplasma*, 255(4), 1065-1077.
- Matthews, R. E. F. 1953. Chemotherapy and plant viruses. *Microbiology*, 8(2), 277-288.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. and Foyer, C.H. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters*. 378:203-206.
- Meryman, H. T., Williams, R. J., & Douglas, M. S. J. 1977. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*. 14(3), 287-302.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 7(9), 405-410.
- Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends in plant science*. 22(1), 11-19.
- Miura, K., & Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*. 5, 4.
- Mora-Herrera, M. E., López-Delgado, H., Castillo-Morales, A. & Foyer, C. H. 2005. Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiologia Plantarum*. 125:430-440.

- Mora-Herrera, M. E., y Lopez-Delgado, H. A. 2006. Tolerancia a baja temperatura inducida por ácidos salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29(2), 81-85.
- Moreno, F., Liz, Patricia. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, mayo 2009. ISSN 2357-3732. [S.l.], v. 27, n. 2, p. 179-191
- Mori, I. C., & Schroeder, J. I. 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant physiology*. 135(2), 702-708.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59:651-681.
- Murakeözy, É. P., Nagy, Z., Duhazé, C., Bouchereau, A., & Tuba, Z. 2003. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of Finland saline vegetation in Hungary. *Journal of Plant Physiology*. 160(4), 395-401.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., Méndez, J.J. 2007. Potencial antioxidante de la *Bauhinia Kalbreyeri Harms* (Fabacea). *Información Tecnológica* 18:65-74.
- Mustafa, M. A., Ali, A., Seymour, G., & Tucker, G. 2018. Delayed pericarp hardening of cold stored mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) upon pre-treatment with the stress hormones methyl jasmonate and salicylic acid. *Scientia Horticulturae*. 230, 107-116.
- Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols*. 6(6), 715-742.
- Mutlu, S., Karadağoğlu, Ö., Atici, Ö., & Nalbantoğlu, B. 2013. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biologia Plantarum*. 57(3), 507-513.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:388-395.
- Ni, W., and Trelease, R. N. 1991. Post-transcriptional regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. *Plant Cell*. 3: 737 – 744.

- Niino, T., & Arizaga, M. V. 2015. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding science*. 65(1), 41-52.
- Niino, T., Watanabe, K., Nohara, N., Rafique, T., Yamamoto, S. I., Fukui, K., & Engelmann, F. 2014. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryoplate. *Plant Biotechnology*. 31(3), 281-287.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*. 49(1), 249-279.
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*. 164(4), 1636-1648.
- Noreen, S., Akhter, M. S., Yaamin, T., & Arfan, M. 2018. The ameliorative effects of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. *Journal of Plant Interactions*. 13(1), 221-230.
- Norma Oficial Mexicana NOM-025-FITO-2000. 2000. Para el establecimiento de zonas bajo protección y zonas libres de plagas cuarentenarias de la papa. Consultada el 12 de enero de 2021. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/562774/NOM-025-FITO-2000_12062000.pdf
- O'Brien, M. J., & Rich, A. E. 1976. *Potato diseases* (No. 474). US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Onofre, J. G., Carballal, A. M., Ordoñez, E. S., & Cedeño, J. F. 2018. Aplicación de la electroterapia para la eliminación del virus del mosaico del pepino (CMV) en plantas micropropagadas de banano (*Musa* spp.).
- Osmond, C. B., & Grace, S. C. 1995 Perspectives on Protoinhibition and photorespiration in the Field. quintessential inefficiencies of light and dark reactions of photosynthesis. *Journal experimental Botany*. 1351-1362.
- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1), 173-188.
- Panis, B., & Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *The role of biotechnology*, 5(7), 43-54.
- Panta, A., Panis, B., Danchez, D., Canepa, P., Ynouye, C., Geuns, J., Swennen, R., Roca, W., Tay, D. 2009. Improved potato cryopreservation based on the identification of biochemical cell compounds linked to response to abiotic stress. Paper presented at the 1st International

- Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species, Leuven, Belgium, 5-9 April 2009.
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B., & Carimi, F. 2016. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38(1), 12.
- Peralta-Pérez, M. del R., & Volke-Sepúlveda T. L. 2012. "La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación." *Revista mexicana de ingeniería química*.11.1: 75-88.
- Percy, R. E., Livingston, N. J., Moran, J. A., & Von Aderkas, P. 2001. Desiccation, cryopreservation and water relations parameters of white spruce (*Picea glauca*) and interior spruce (*Picea glauca*× *engelmannii* complex) somatic embryos. *Tree physiology*. 21(18), 1303-1310.
- Poobathy, R., Sinniah, U. R., Xavier, R., & Subramaniam, S. 2013. Catalase and superoxide dismutase activities and the total protein content of protocorm-like bodies of *Dendrobium Sonia-28* subjected to vitrification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170(5), 1066-1079.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., & Stewart, C. R. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiological*. 105: 619–627.
- Quan, L., Zhang, B., Shi, W., Li, H. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrate Plant Biology* 50:2-18.
- Rahmah, S., Ahmad Mubbarakh, S., Soo Ping, K., & Subramaniam, S. 2015. Effects of droplet-vitrification cryopreservation based on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium* shooting star orchid. *The Scientific World Journal*. 2015, vol. 2015.
- Rajasekharan, P. E. 2006. *In vitro* conservation of horticultural crops. ICAR short course on *in vitro* conservation and cryopreservation new options to conserve horticultural genetic resources. Hessaraghatta Lake: Indian Institute of Horticultural Research. 66-73.
- Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., & Schroeder, R. 2007. RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA biology*. 4(3), 118-130.
- Ramgareeb, S., Snyman, S.J., Van Antwerpen, T., Rutherford, R.S. 2010. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell Tissue and Organisms*. 100: 175-181.

- Rangel-Sánchez, G., Castro-Mercado, E., & García-Pineda, E. 2014. Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*. 171(3-4), 189-198.
- Rao, M. V., Poliyath, G., & Ormrod, D. 1997. Ultraviolet and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 110:125-136.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43, pp. 439-463.
- Reed, B. M., Schumacher, L., Dumet, D., & Benson, E. E. (2005). Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of *Ribes* germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), 431-436.
- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338.
- Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A., & Hurry, V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*. 49, 35-150.
- Ruiz-Sáenz, D. R., Ayala-Hernández, D. D., Niino, T., Cruz-Gutiérrez, E. J., Aquino-Martínez, J. G., & López-Delgado, H. A. 2019. Salicylic Acid-Cryotherapy Treatment for Elimination of Potato Virus S from *Solanum tuberosum*. *American Journal of Potato Research*. 96(3), 225-234.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., Pessarakli, M., 2014. Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. *Journal of Plant Nutrition*. 37 (10), 1573–1585. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.868483>.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 9:30–33.
- Sakai, A., & Larcher, W. 1987. Low temperature and frost as environmental factors. In *Frost Survival of Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1-20. doi:10.1007/978-3-642-71745-1.
- Sakai, A., and Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryo-Letters*. 28(3), 151-172.
- Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, 74(2), 243-248.

- Saleem, M., Qazi, F., & Tibor J. 2020. "Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: a review." *Journal of Plant Growth Regulation* .1-22.
- Salisbury, F. B., & Ross, C.W. 1991 *Plant Physiology*. 4th Edition, Wadsworth Publishing Company, Beverly, 481.
- Salomón, J. L., Estévez, A., González, M. E., Castillo, J., Cordero, M., Quiñones, Y., & Bonierbale, M. (2004). Selección de clones promisorios de papa con resistencia a los principales virus en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 25(1), 71-75.
- Salwa, A.O., Mona, G.D., Salman, S.R. 2015. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. *Scientia Agricola* 9(1):49–59.
- Sánchez, G. E., Slack, S. A. y Dodds, J. H. 1991. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy. *American Potato Journal*. 68:299-315.
- Sasheva, P., Szalai, G., Janda, T., & Popova, L. 2010. Study of the behaviour of antioxidant enzymes in the response to hardening and freezing stress in two wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Acta Agronomica Hungarica*. 61(2), 161-172.
- Scandalios, J. G., Guan, L. & Polidoros, A. N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Scandalios J. G. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 343 – 406.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:995-1014.
- Schäfer-Menuhr, A., Schumacher, H. M., & Mix-Wagner, G. 1994. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff. *Landbauforschung Völkenrode*. 44(4), 301-313.
- Sergieva, I., Alexieva, V., Karanov, E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences Sci*. 1997;51:121–4.
- Sewelam, N., Kazan, K., & Schenk, P. M. 2016. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 7, 187.

- Sgherri, C., Milone, M. T., Clijsters, H. and Navari-Izzo, F. 2001. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to subsymptomatic copper doses. *Journal of Plant Physiology*. 158:1439-1447.
- Sharifi, P. 2010. Evaluation on sixty-eight rice germplasms in cold tolerance at germination stage. *Rice Science*. 17(1), 77-81.
- Sharma, P., Ambuj, B. J. H., Rama, Sh. D., and Mohammad, P. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, *Journal of Botany*., pp. 26.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53(372):1305-1319.
- Sifuentes, I. E., Ojeda, W., Mendoza, C., Macía, J., Rúelas, J. D. R., & Inzunza, M. A. 2013. Nutrición del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) considerando variabilidad climática en el " Valle del Fuerte", Sinaloa, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 4(4), 585-597.
- Signorelli, S., & Monza, J. 2017. Identification of Δ 1-pyrroline 5-carboxylate synthase (P5CS) genes involved in the synthesis of proline in *Lotus japonicus*. *Plant Signaling & Behavior*, 12(11), 1367464.
- Singh, T. N., Paleg L. G., & Aspinnall, D. 1973. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Australian Journal of Biological Sciences*. 26, 45-56.
- Skiada, F. G., Grigoriadou, K., Maliogka, V. I., Katis, N. I., & Eleftheriou, E. P. 2009. Elimination of Grapevine leafroll-associated virus 1 and Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets. *Journal of Plant Pathology*, 177-184.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., & Miszalski, Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*. 54(1), 39-50.
- Snyman, S. J., Meyer, G. M., Koch, A. C., Banasiak, M., & Watt, M. P. 2011. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 47(2), 234-249.

- Sofa, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(6), 13561-13578.
- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., & Bryan, G. J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *proceedings of the national academy of sciences*, 102(41), 14694-14699.
- Srivastava, M. K., & Dwivedi, U. N. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant science*.158(1-2), 87-96.
- Steponkus, P. L. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Advances in low temperature Biology*. 1(1) 1-61.
- Sudesh, K. Y. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA. 30 (3).
- Szechyńska-Hebda, M., Skrzypek, E., Dąbrowska, G., Wędzony, M., van Lammeren, A. 2012. The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34:547-560.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006 *Plant physiology*. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Tajdoost, S., Farboodnia, T., & Heidari, R. 2007. Salt pretreatment enhance salt tolerance in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 10(12), 2086-2090.
- Tamura, T., Hara, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., & Sano, H. 2003. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology*, 131(2), 454-462.
- Terzi, R., Kadioglu, A., Kalaycioglu, E., & Saglam, A. 2014. Hydrogen peroxide pretreatment induces osmotic stress tolerance by influencing osmolyte and abscisic acid levels in maize leaves. *Journal of Plant Interactions*. 9(1), 559-565.
- Thomashow, M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant physiology*, 118(1), 1-8.
- Thomashow, M.F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, 125, 89- 93. doi:10.1104/pp.125.1.89.

- Towill, L. E. 1984. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotomum, Tuberosum, and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Letters*.
- Towil L.E.Bonnart R. 2003. Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. *CryoLetters* 24:341-346
- Uchendu, E. E., Leonard, S. W., Traber, M. G., & Reed, B. M. 2010 a. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Reports*. 29(1), 25-35.
- Uchendu, E. E., Muminova, M., Gupta, S., & Reed, B. M. 2010 b. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46(4), 386-393.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*. 163:515-523.
- Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M., & Takahashi, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*. 8(7). 418-421.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., & Van Breusegem, F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant physiology*. 139(2), 806-821.
- Verbruggen, N., & Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*. 35(4), 753-759.
- Vianna, M. G., Garcia, R. O., Mansur, E., Engelmann, F., & Pacheco, G. 2019. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* . 139(2), 369-379.
- Viswanathan, C., Jianhua, Z. and Jian-Kang, Z. 2007 Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12, 444-451. doi:10.1016/j.tplants.2007.07.002
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
- Volk, G. M., & Walters, C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*. 52(1), 48-61.

- Volk, G. M., Shepherd, A. N., & Bonnart, R. 2018. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pre-treatment combinations applied to nine species. *CryoLetters*, 39(5), 322-330.
- Wang, X., Hou, C., Liu, J., He, W., Nan, W., Gong, H., Bi, Y. .2013. Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* .35:891-900.
- Wang, Q. C., & Valkonen, J. P. T. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*. 154(1-2), 135-145.
- Wang, Q., & Valkonen, J. 2009. Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of in vitro-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Cryo-Letters*. 30(3), 171-182.
- Wang, Q., & Valkonen, J. P. 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14(3). 119-122.
- Wang, Q., Liu, Y., Xie, Y., & You, M. 2006. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research*. 49(2), 119-129.
- Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C. T., Gafny, R., y Perl, A. 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation–vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.77(3), 267-275.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, W., Wang, X., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., & Jiang, D. 2018. Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. *Frontiers in Plant Science*. 9, 1137.
- Wang, Z. C., & Deng, X. X. 2004. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *CryoLetters*. 25(1), 43-50.
- Wen, B., Wang, R., Cheng, H., & Song, S. 2010. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. *Protoplasma*, 239(1-4), 57-67.
- Willekens H, Inze D, Van Montagu M and Van Camp W. 1995. Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207-228.

- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. 16: 4806–4816.
- Willekens H., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W. 1994. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* L. Letter. 352: 79 – 83.
- Xin, Z., & Li, P. H. 1993. Relationship between proline and abscisic acid in the induction of chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant physiology*, 103(2), 607-613.
- Xiong, J., Yang, Y., Fu, G., & Tao, L. 2015. Novel roles of hydrogen peroxide (H₂O₂) in regulating pectin synthesis and demethylesterification in the cell wall of rice (*Oryza sativa*) root tips. *New Phytologist*, 206(1), 118-126.
- Yamamoto, S. I., Fukui, K., Rafique, T., Khan, N. I., Castillo Martinez, C. R., Sekizawa, K., & Niino, T. 2012. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genetic Resources*, 10(1), 14.
- Yamamoto, S. I.; Rafique, T.; Arizaga, M. V.; Fukui, K.; Gutiérrez, E. J. C.; Martínez, C. R. C. and Niino, T. 2015. The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips. *American Journal Potato Research*. 92(2):250-257.
- Yan, S., & Dong, X. 2014. Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current opinion in plant biology*. 20, 64-68.
- Yan, Y., Pan, C., Du, Y., Li, D., & Liu, W. 2018. Exogenous salicylic acid regulates reactive oxygen species metabolism and ascorbate–glutathione cycle in *Nitraria tangutorum* Bobr. under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(4), 577-589.
- Yoon, S., & Seger, R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*, 24(1), 21-44.
- Yordanova, R. Y., & Popova, L. P. 2007. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(6), 535-541.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 7(5), 751-760.
- Yoshida, S. and Uemura, M. 1990. Responses of the plasma membrane to cold acclimation and freezing stress. In: Larsson C. and Moller, I.M. Eds., *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function, and Molecular Biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 293-319.

- Zárate-Polanco L.M.; Ramírez-Suárez L.M.; Otálora- Santamaría N.A.; Prieto L.; Garnica-Holguín A.M.; Cerón-Lasso M.S; Argüelles J.H. 2014. Extracción y caracterización de almidón nativo de clones promisorios de papa criolla (*Solanum tuberosum*, Grupo *Phureja*). Revista Latinoamericana de la papa, 18(1), 1-24.
- Zhang, D., Ren, L., Chen, G. Q., Zhang, J., Reed, B. M., & Shen, X. H. 2015. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. Plant cell reports, 34(9), 1499-1513.
- Zhang, W., He, S. Y., & Assmann, S. M. 2008. The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. The Plant Journal, 56(6), 984-996.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances, 23(4), 283-333.
- Zyalalov, A. 2004. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. Russian Journal Plant Physiology. 51(4), 547-5.

ANEXOS

ANEXO A

Soluciones para medios de cultivo

Cuadro A-1. Soluciones madre para preparar medio Murashige Skoog

REACTIVO	PREPARACIÓN
Sulfato de Magnesio	Pesar 3.7 g de Sulfato de Magnesio disolver en 100mL de agua destilada. Guardar a 4°C
Sulfato de Hierro*	Pesar por separado Na_2EDTA 0.75 g y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.55 g disolver cada uno en 20mL de agua destilada. Mezclar ambos y aforar a 100 mL. Guardar a 4°C
Tiamina	Pesar 40 mg de Tiamina y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4°C
Pantotenato de calcio	Pesar 100 mg de Pantotenato de calcio y disolver en 100 mL de agua destilada. Congelar en porciones pequeñas
Glicina	Pesar 10 mg de Glicina y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4°C
Ácido Nicotínico	Pesar 50 mg de Ácido Nicotínico y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4°C
Piridoxina	Pesar 50 mg de piridoxina y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4°C
Ácido Giberélico	Pesar 10 mg de Ácido Giberélico y disolver en 2 mL de alcohol etílico. Aforar a 100mL. Guardar a 4°C
Ácido Naftalenoacético	Pesar 10 mg y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar en congelación
Bencilaminopurina	Pesar 10 mg y disolver en 100mL de agua destilada. Guardar en congelación
Inositol	Pesar 1g y disolver en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4°C

*El Na_2EDTA se calienta un poco para disolver

Cuadro A-2 Solución madre de sales para medio ms

REACTIVO	1 LITRO
Nitrato de amonio	17.5 g
Nitrato de potasio	20 g
Cloruro de calcio	4.5 g
Fosfato de potasio	1.75 g
Ácido bórico	50 mg
Sulfato manganoso	200 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	100 mg
Yoduro de potasio	10 mg
Molibdato de sodio	2.5 mg
Sulfato cúprico/	0.5 mL

*Pesar 5 mg de cada reactivo y disolver por separado en 4mL, mezclar y aforar a 10mL para tomar el volumen requerido de acuerdo con la tabla.

Cuadro A-3. Medio Murashige Skoog pH 5.7

REACTIVO	1 LITRO
Sales	100 mL
Sulfato de magnesio	10 mL
Sulfato de hierro	5 mL
Myo-inositol	10 mL
Glicina	20 mL
Tiamina	1 mL
Ácido nicotínico	1 mL
Piridoxina	1 mL
Ácido giberelico	1 mL
Sacarosa	30 g
Phytigel	2.25 g

Cuadro A-4. Solución madre de sales para medio MS sin calcio

REACTIVO	1 LITRO
Nitrato de amonio	17.5 g
Nitrato de potasio	20 g
Fosfato de potasio	1.75 g
Ácido bórico	50 mg
Sulfato manganeso	200 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	100 mg
Yoduro de potasio	10 mg
Molibdato de sodio	2.5 mg
Sulfato cúprico*	0.5 mL
Cloruro de cobalto*	

* Pesar 5 mg de cada reactivo y disolver por separado en 4 mL, mezclar y aforar a 10 mL para tomar el volumen requerido de acuerdo con la tabla.

Cuadro A-5. Medio Murashige Skoog sin calcio pH 5.8

REACTIVO	1 LITRO
Sales libres de calcio	100 mL
Sulfato de magnesio	10 mL
Sulfato de hierro	5 mL
Myo-inositol	10 mL
Glicina	20 mL
Tiamina	1 mL
Ácido nicotínico	1 mL
Piridoxina	1 mL
Ácido giberélico	1 mL
Sacarosa	30 g
Phytigel	2.25 g

ANEXO B

Soluciones para Criogenia

Cuadro B-1. Alginato de sodio pH 5.8 para método de D-crioplaca

REACTIVO	PARA 100 mL
Medio MS sin calcio	10 mL
Sacarosa 0.4 M	13.692 g
Alginato de sodio 3%	3 g
Agua	90 mL

Nota: Esterilizar a 121°C, 18min y guardar en alícuotas de 1mL a 4°C.

Cuadro B-2. Cloruro de calcio pH 5.8 para método de D-crioplaca

REACTIVO	PARA 100mL
Medio MS sin calcio	10 mL
Sacarosa 0.4 M	13.692 g
Cloruro de calcio 0.1 M	1.11 g
Agua	90 mL

Nota: Esterilizar a 121°C, 18min y guardar en alícuotas de 10mL a 4°C

Cuadro B-3. Solución de carga (LS) pH 5.8 para método de D-crioplaca

REACTIVO	PARA 100 mL
Medio MS normal	10 mL
Sacarosa 0.8 M	27.384 g
Glicerol 2 M	14.722 mL
Agua destilada	75.278 mL

Nota: Esterilizar a 121°C, 18min y guardar en alícuotas de 45mL a 4°C

Cuadro B-4. Sacarosa 0.4 M, pH 5.8 para método de D-crioplaca

REACTIVO	PARA 100mL
Medio MS	10 mL
Sacarosa 1 M	34.23 g
Agua	90 mL

Nota: Esterilizar a 121°C, 18min y guardar en alícuotas de 10 a 4°C

ANEXO C

Actividad de catalasa

Cuadro C-1 Buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.2 para Catalasa

REACTIVO	PARA 100mL
Solución de fosfato monobásico de potasio	Pesar 0.340g de fosfato monobásico de potasio y disolver en 50 mL de agua destilada
Solución de fosfato dibásico de potasio	Pesar 0.87g de fosfato dibásico de potasio y disolver en 100 mL de agua destilada

Nota: Guardar a 4°C. Añadir la solución de fosfato dibásico a la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH

Cuadro C-2 Buffer de extracción, pH 7.2 para Catalasa

REACTIVO	PARA 100mL
Solución de fosfatos pH 7.2 50mM	100 mL
EDTA 1mM	0.037 g
PVP 2%	2 g
DTT 5Mm	0.077 g

Nota: Guardar en alícuotas de 5mL en congelación

Cuadro C-3 Buffer de fosfatos de potasio y sodio 50mM pH 7.0 para Catalasa

REACTIVO	PARA 250 mL
Solución de fosfato monobásico de potasio	Pesar 0.680 g fosfato monobásico de potasio y disolver en 100 mL de agua destilada
Solución de fosfato dibásico de sodio	Pesar 1.06 g fosfato dibásico de sodio y disolver en 150 mL de agua destilada

Nota: Guardar a 4°C. Añadir la solución de fosfato dibásico a la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH

Cuadro C-4 Solución de peróxido de hidrógeno al 30% para Catalasa

REACTIVO	PARA 50 mL
Peróxido de hidrógeno 30%	170 μ L
Solución de fosfatos de potasio y sodio 50 mM pH 7.0	49.83 mL

Nota: Prepara en fresco cada que se realice la técnica.

ANEXO D

Actividad de peroxidasa

Cuadro D-1. Buffer de fosfatos de potasio 50mM pH 7.2 para peroxidasa

REACTIVO	PARA 100 mL
Solución de fosfato monobásico de potasio	Pesar 0.340 g de fosfato monobásico de potasio y disolver en 50 mL de agua destilada
Solución de fosfato dibásico de potasio	Pesar 0.87 g fosfato de dibásico de potasio y disolver en 100 mL de agua destilada

Nota: Guardar a 4°C. Añadir la solución de fosfato dibásico a la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH

Cuadro D-2. Buffer de fosfatos de extracción, pH 7.2 para peroxidasa

REACTIVO	PARA 100 mL
Solución de fosfatos pH 7.2 50mM	100 mL
EDTA 1mM	0.037 g
PVP 1%	1 g
DTT 5mM	0.077 g

Nota: Guardar en alícuotas de 5mL en congelación

Cuadro D-3. Buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.0 para peroxidasa

REACTIVO	PARA 250mL
Solución de fosfato monobásico de sodio	Pesar 0.344 g de fosfato monobásico de sodio y disolver en 50 mL de agua destilada
Solución de fosfato dibásico de sodio	Pesar 0.7098 g fosfato dibásico de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada

Nota: Guardar a 4°C. Añadir la solución de fosfato dibásico a la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH

Cuadro D-4. Solución de peróxido de hidrógeno al 30% para peroxidasa

REACTIVO	PARA 50mL
Peróxido de hidrógeno 30%	170 μ l
Solución de fosfatos de potasio y sodio 50mM pH 7.0	49.83mL

Nota: Prepara en fresco cada que se realice la técnica.

Cuadro D-5. Mezcla de reacción para peroxidasa

REACTIVO	PARA 125 mL
Peróxido de hidrógeno 30%	56.25 μ L
Solución de fosfatos de sodio 50mM pH 7.0	125 mL
Guayacol	51.25 μ L

Nota: Prepara en fresco cada que se realice la técnica.

ANEXO E

Contenido de prolina

Cuadro E-1. Soluciones de prolina.

REACTIVO	PREPARACIÓN
Ácido fosfórico 6 M.	Medir 8.12 mL de ácido fosfórico y mezclar con 11.88 mL de agua destilada.
Ninhidrina ácida**	Pesar 1.25 g de ninhidrina y disolver en 30mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido fosfórico 6M. Calentar un poco la mezcla para disolver
Ácido sulfosalicílico 3%	Pesar 3 g de ácido sulfosalicílico y disolver en 100 mL de agua destilada
Prolina	Pesar 0.1151 g de prolina y disolver en 50 mL de ácido sulfosalicílico 3%

**Prepara en fresco cada que se realice la técnica. Nota: Guardar a 4°C

Cuadro E-2. Curva de calibración de prolina.

Tubo	Solución de Prolina (mL)	Solución de Ácido Sulfosalicílico (mL)	Concentración de Prolina (nmol)
1	0	2	0
2	0.05	1.95	20
3	0.10	1.90	40
4	0.20	1.80	80
5	0.40	1.60	160
6	0.60	1.40	240
7	0.80	1.20	320
8	1.00	1.00	400
9	1.50	0.50	600
10	2.00	0	800

Nota: Para la curva se realiza una solución diluida de 0.4mL de la solución madre de prolina y se afora a 20mL de solución de ácido sulfosalicílico al 3%. Para obtener una concentración de 400nmol mL⁻¹

Cuadro E-3. Solucion madre de prolina.

REACTIVO	PARA 5 mL*
Prolina	11.51 mg
Ácido Sulfosalicílico 3%	5 mL

*Equivalente a 0.00002mol mL⁻¹.

ANEXO F

Contenido de peróxido de hidrógeno por espectrofotometría

Cuadro F-1. Buffer de fosfatos de potasio 10 mM pH 7 para contenido de peróxido de hidrógeno.

REACTIVO	PARA 100 mL
Solución de fosfato monobásico de potasio	Pesar 0.068 g y disolver en 50 mL de agua destilada
Solución de fosfato dibásico de potasio	Pesar 0.174 g y disolver en 100 mL de agua destilada

Nota: Guardar a 4°C. Añadir la solución de fosfato dibásico a la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH

Cuadro F-2. Soluciones de yoduro de potasio para contenido de peróxido de hidrógeno

REACTIVO	PREPARACIÓN
Yoduro de potasio 1M	Pesar 4.15g y disolver en 25 mL de buffer de fosfatos 10mM pH 7

Nota: Prepara en fresco cada que se realice la técnica. Guardar a 4°C.

Cuadro F-3. Soluciones madre de peróxido de hidrógeno para contenido de peróxido de hidrógeno

REACTIVO	PREPARACIÓN
Peróxido de Hidrógeno al 0.0057%	Medir 57 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% y aforar a 100 mL con agua

Nota: Preparar en fresco cada que se realice la técnica. Guardar a 4°C.

Cuadro F-4. Curva de calibración de contenido de peróxido de hidrógeno

Tubo	Peróxido de hidrógeno 0.0057%	Buffer de fosfatos de potasio 10mM (mL)	Yoduro de potasio 1 M (mL)	μ moles
1	0	1	1	557
2	0.1	0.9	1	501.3
3	0.2	0.8	1	445.6
4	0.4	0.6	1	334.2
5	0.6	0.4	1	222.8
6	0.8	0.2	1	111.4
7	1	0	1	0

Nota: Para la curva se realiza una solución diluida de 1mL de la solución madre de peróxido de hidrógeno y se afora a 10mL con agua destiladas. Para obtener una concentración de 557 μ moles mL⁻¹

ANEXO G

Potencial hídrico

Cuadro G-1 Soluciones calibradoras para potencial hídrico (100mL)

SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO	Gramos de Cloruro de sodio (g)
0	0
0.1	0.79
0.2	1.58
0.3	2.37
0.4	3.16
0.5	3.95
0.6	4.74

Nota: aforar con agua destilada