



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN GÉNICA
EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE VID (*Vitis vinífera* L.)
DURANTE LA CRIOCONSERVACIÓN**

Por:

Q.A. Mariana Quijada Rivera

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

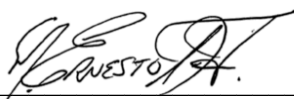
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mariana Quijada Rivera la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Marisela Rivera Domínguez
Director de Tesis



Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate
Integrante del comité de tesis



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudio de la Regulación en la Expresión Génica en Embriones Cigóticos de Vid (*Vitis vinífera* L.) Durante la Crioconservación” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Mariana Quijada Rivera, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de su institución para realizar mis estudios de maestría.

A Dra. Marisela Rivera Domínguez, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento, por compartir su experiencia, tenerme la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo del proyecto, por su apoyo, su constancia y sus múltiples palabras de aliento cuando más lo necesité.

A mi comité de tesis por aceptarme como su alumno y su contribución para la realización del proyecto. A Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate por la atención prestada, asesorías, paciencia y disponibilidad. También a Dr. Martín Ernesto Tizado Hernández por siempre estar atento al proyecto y fomentar en mi persona el amor por generar nuevo conocimiento. A Dra. Irasema Vargas Arispuro por sus observaciones que ayudaron a enriquecer el presente trabajo. A Dra. María Fernanda Lazo Javalera por su orientación, críticas objetivas, conocimiento y recomendaciones.

A la QB. Karen Rosalinda Astorga Cienfuegos por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A mis padres, Margarita Rivera Domínguez y José Ángel Quijada Espinoza por siempre ser el motor que impulsa mis sueños, quienes estuvieron a mi lado en todo momento, por ser los mejores guías de vida, siempre confiar en mí y ser mi mayor inspiración.

A mi pareja Q.B.C. Juan Luis García Vázquez por acompañarme durante el proceso, el apoyo y por siempre darme fuerza.

A todas las personas que hicieron posible este trabajo ¡MUCHAS GRACIAS!

DEDICATORIA

A mis padres, les dedico a ustedes este logro como una meta más conquistada, jamás terminaré de agradecerles lo que hacen por mí, sin ustedes no sería nada de lo que soy. Los amo mucho.

A mi pareja por comprenderme, amarme y apoyarme incondicionalmente, te amo.

A Mila y Maia porque con su alegría me ayudaron en todo momento a sentirme mejor, las amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1. La Conservación de la Biodiversidad y Cultivos Vegetales.....	17
2.2. La Biotecnología en la Conservación de la Biodiversidad Vegetal	17
2.3. Conservación de Germoplasma Vegetal.....	18
2.4. Conservación a Largo Plazo: Crioconservación de Plantas	19
2.4.1 Historia de la Crioconservación de Plantas	19
2.4.2 Tejidos Utilizados en la Crioconservación de Plantas.....	21
2.4.3 Características Biofísicas de la Crioconservación	22
2.4.4 Protocolos de Crioconservación de Tejidos Vegetales.....	23
2.4.4.1 Vitricación.	24
2.4.4.2 Encapsulación-deshidratación.....	24
2.4.4.3 Encapsulación-vitricación.	25
2.4.4.4 Crioplasmas V-D.	25
2.4.5 Efectos de la Crioconservación de Tejidos Vegetales	26
2.4.5.1 Análisis de efectos moleculares (transcriptómica) de la crioconservación en plantas.....	28
2.4.5.2 Cascada de señalización y percepción de señales de estrés.....	28
2.4.5.3 Factores de transcripción y transducción de señales ROS.....	29
2.4.5.4 Respuestas de vías metabólicas.....	31
2.5. Importancia del Cultivo de Vid (<i>Vitis vinifera</i> L.)	31
2.5.1 Estudios de Crioconservación de Vid (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	32
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Particulares.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Material Vegetal	37

CONTENIDO (continuación)

5.2. Protocolo de Desinfección.....	37
5.3. Maduración del Embrión en Semilla de Vid	37
5.4. Extracción del Embrión Cigótico	38
5.5. Protocolos de Crioconservación	38
5.6. Extracción de ARN de Embriones Cigóticos de Vid y Síntesis de ADNc.....	39
5.7. Secuenciación de Transcriptoma	39
5.8. Análisis de Calidad y Filtrado de Lecturas.....	39
5.9. Alineamiento Contra Genoma de Referencia y Cuantificación del Número de Lecturas	40
5.10. Identificación de Genes Expresados Diferencialmente	40
5.11. Análisis de Enriquecimiento, Distribución de Enzimas y Caracterización de Genes Identificados como Expresados Diferencialmente	41
5.12. Diseño de Oligonucleótidos Para Genes Seleccionados Respuesta al Estrés por Frio	41
5.13. Validación de Transcriptoma Mediante Cuantificación de Expresión Relativa Utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.....	42
5.14. Métodos Estadísticos	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
6.1. Extracción de ARN de Embriones Cigóticos de Vid	43
6.2. Secuenciación de Transcriptoma y Análisis de calidad.....	43
6.3. Alineamiento Contra Genoma de Referencia y Cuantificación de Lecturas.....	44
6.4. Genes Expresados Diferencialmente	46
6.5. Análisis de Enriquecimiento.....	47
6.6. Distribución en Clasificación de Enzimas (EC) Presentes en el Transcriptoma a Causa de Congelamiento/Descongelamiento	51
6.7. Identificación de Genes Expresados Diferencialmente	54
6.8. Diseño de Oligonucleótidos Específicos de Genes Seleccionados para Validación del Transcriptoma.....	59
6.9. Ensayo de Disociación de los Oligonucleótidos Diseñados para los Genes Proteína de Choque Térmico 17.3 Kda, Proteína sin Nombre, Expansina-A1 y Atpasa Subunidad 1	61
6.10. Rangos Dinámicos de los Genes Proteína de Choque Térmico 17.3 Kda, Proteína sin Nombre, Expansina-A1 y Atpasa Subunidad 1 Contra el Gen Constitutivo GAPDH y Análisis de Eficiencia de Amplificación Utilizando RT-PCR.....	62
6.11. Expresión Relativa de los Genes Proteína de Choque Térmico 17.3 Kda, Proteína sin Nombre, Expansina-A1 y Atpasa Subunidad 1 Mediante Qrt-PCR.....	63
7. CONCLUSIONES.....	68
8. PERSPECTIVAS	69
9. BIBLIOGRAFÍA.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Gráfico de Escalamiento Multidimensional (MDS) comparativo de tratamientos y réplicas de embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) expuestos a congelamiento y descongelamiento durante la criopreservación. Cada tratamiento se representa con el mismo color y el número después del punto indica réplica biológica.	45
2. Mapa de calor de la Correlación de Pearson con escala de color. Comparativo de tratamientos y réplicas de embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) expuestos a congelamiento y descongelamiento durante la criopreservación.	46
3. Gráfico de volcán que indica la distribución global de log ₂ FC (veces el cambio en la expresión génica) y el valor FDR en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento por criopreservación. El conjunto adyacente de puntos representa genes con aumento en su expresión o inducidos (rosas) y genes reprimidos (morados) en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento durante la criopreservación.	47
4. Gráfico de Vías GO (ontología genética) enriquecidas de los genes inducidos en respuesta al congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.). Se muestra el porcentaje de diferencia entre referencia y transcriptoma probado. Categorizados en proceso biológico (lila), componente celular (verde) y función molecular (rosas).	48
5. Gráfico de Vías GO (ontología genética) enriquecidas de los genes reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.). Mostrando el porcentaje de diferencia entre referencia y transcriptoma probado. Categorizados en proceso biológico (lila), componente celular (verde) y función molecular (rosa).	50
6. Gráfico de Distribución EC (Números de la Comisión de enzimas) en Genes Inducidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.). Cada color representa a una Clasificación primaria de las enzimas.	52
7. Gráfico de Distribución EC (Números de la Comisión de enzimas) en Genes Reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.). Cada color representa a una clasificación primaria de las enzimas.	53
8. Genes más inducidos y más reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.). Muestra log ₂ FC (veces el cambio en la expresión) y listado de genes identificados. Solo se presentan los genes con Log ₂ FC con los valores más altos.	56
9. Curvas de Disociación. Generadas utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para los genes Proteína de choque térmico 17.3 Kda (A), Proteína sin Nombre (B), Expansina-A1 (C) y ATPasa subunidad 1(D).	61

LISTA DE FIGURAS (continuación)

10. Gráfico de Rangos Dinámicos Genes Diana contra Gen Referencia GAPDH. Proteína sin Nombre (A), Proteína de choque térmico 17.3 Kda (B), ATPasa subunidad 1(C) y Expansina-A1 (D).63
11. Gráfico Valores de Ciclo de umbral (Ct) comparativo. Muestras control (PVS2) y Tratamiento (PVS2NL). Las barras corresponden a la media \pm error estándar.....64
12. Expresión Relativa de Genes Proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP 17.3), Proteína sin Nombre (PSN), Expansina-A1 (EXP-A1) y ATPasa subunidad 1 (ATPasa sub1). Los datos se muestran como la media \pm DE. 2 Réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas.65
13. Expresión Relativa de Genes Seleccionados en el Transcriptoma. Proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP 17.3), Proteína sin Nombre (PSN), Expansina-A1 (EXP-A1) y ATPasa subunidad 1 (ATPasa sub1).65
14. Modelo hipotético propuesto para la respuesta molecular causada por el congelamiento/descongelamiento en embriones cygóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). El gráfico contiene los genes identificados en el transcriptoma como expresados diferencialmente.....67

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Información de Estudios de Crioconservación en Vid	32
2. Concentración y calidad de muestras de ARN.	43
3. Porcentaje de alineamiento utilizando el programa Bowtie2, $p < 0.05$ en embriones cigóticos de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación.	44
4. Lista de Genes Identificados Expresados Diferencialmente a causa del congelamiento/descongelamiento. Mostrando su ID de Ensembl plant, nombre, log2FC (veces el cambio en la expresión) los valores positivos indican inducción mientras que los negativos represión y categoría en GO: Vías en las que se encuentran involucrados.	55
5. Oligonucleótidos de genes seleccionados para validación de transcriptoma en respuesta a congelamiento/descongelamiento. TM: melting temperature (temperatura de fusión en °C), AP: Amplicón (tamaño).	60

RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de importancia mundial desde el punto de vista económico y gastronómico. Debido a esto, es importante aplicar metodologías para la conservación de su germoplasma. La crioconservación es una técnica para el almacenamiento de recursos fitogenéticos, que expone los tejidos a diferentes tipos de estrés abiótico que puede conducir a cambios fenotípicos y genómicos. Sin embargo, existe poca información acerca del mecanismo molecular de respuesta de los embriones de uva al tratamiento de crioconservación. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue obtener el transcriptoma de embriones cigóticos de uva tratados con el procedimiento de crioconservación. El ARN se obtuvo de embriones de semillas de uva cv. Red Globe expuestos a la solución vitrificante PVS2 y a la solución PVS2 en combinación con congelación nitrógeno líquido y posterior descongelación rápida. La secuenciación se realizó en Illumina NextSeq 500. La alineación promedio de lecturas fue del 96% frente al genoma de referencia. Los perfiles de expresión mostraron 229 genes expresados diferencialmente por procedimiento de crioconservación de los cuales 186 fueron reprimidos y 46 inducidos. Los principales procesos biológicos que mostraron enriquecimiento en los genes inducidos fueron ensamblaje de nucleosomas y regulación negativa del crecimiento de órganos. Por otro lado, los procesos que mostraron enriquecimiento de genes reprimidos fueron los relacionados con organización de la pared celular y componentes de la membrana. El análisis del transcriptoma mostró que dentro de los genes expresados diferencialmente se encuentran mayormente inducidos el producto proteico sin nombre (ID:VIT_01s0146g00320) que es componente integral de membrana y proteína de choque térmico 17,3 kDa clase II (ID:VIT_04s0008g01550). Dentro de los reprimidos se encuentra la ATPasa subunidad 1 (ID:VIT_00s0733g00010) y Expansina-A1 (ID:VIT_01s0026g02620). La validación del transcriptoma se logró utilizando los cuatro genes mencionados. Los resultados obtenidos indican cambios en la transcripción de genes posiblemente relacionados con procesos epigenéticos y con el aumento en la reserva de nutrientes. También ocurre una disminución en los procesos energéticos, con la finalidad de sobrellevar el estrés, en donde se observó una desactivación de componentes de la membrana celular como la proteína sin nombre y ATPasa, posiblemente a causa de los cambios en la fluidez de esta provocados por las alteraciones en la temperatura, todo esto

debido al congelamiento y descongelamiento durante el proceso de crioconservación de los embriones cigóticos de vid.

Palabras clave: Vid, *Vitis vinifera*, Crioconservación, PVS2, Genes, Vitrificación.

ABSTRACT

The grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a crop of global importance from the economic and gastronomic point of view. Because of this, it is important to apply methodologies for the conservation of your germplasm. Cryopreservation is a technique for the storage of plant genetic resources, which exposes tissues to different types of abiotic stress that can lead to phenotypic and genomic changes. However, there is little information about the molecular mechanism of response of grape embryos to cryopreservation treatment. Consequently, the objective of the present study was to obtain the transcriptome of grape zygotic embryos treated with the cryopreservation procedure. RNA was obtained from grape seed embryos cv. Red Globe exposed to PVS2 vitrifying solution and PVS2 solution in combination with liquid nitrogen freezing and subsequent rapid thawing. Sequencing was performed on the Illumina NextSeq 500. The average alignment of reads was 96% against the reference genome. The expression profiles showed 229 genes differentially expressed by cryopreservation procedure, of which 186 were repressed and 46 induced. The main biological processes that showed enrichment in the induced genes were nucleosome assembly and negative regulation of organ growth. On the other hand, the processes that showed enrichment of repressed genes were those related to the organization of the cell wall and membrane components. Transcriptome analysis showed that within the differentially expressed genes, the unnamed protein product (ID: VIT_01s0146g00320), which is an integral component of the membrane and 17.3 kDa class II heat shock protein (ID: VIT_04s0008g01550), are mainly induced. Within the repressed is the ATPase subunit 1 (ID: VIT_00s0733g00010) and Expansin-A1 (ID: VIT_01s0026g02620). Transcriptome validation was achieved using the four genes mentioned. The results obtained indicate changes in the transcription of genes possibly related to epigenetic processes and with the increase in the reserve of nutrients. A decrease in energy processes also occurs, in order to cope with stress, where a deactivation of cell membrane components such as unnamed protein and ATPase was observed, possibly due to changes in its fluidity caused by alterations in temperature, all this due to freezing and thawing during the cryopreservation process of zygotic vine embryos.

Keywords: Grapevine, *Vitis vinifera*, Cryopreservation, PVS2, Genes, Vitrification.

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es fuente de todos los cultivos desde el comienzo de la civilización humana. El origen de la biotecnología está muy arraigado en la historia humana desde el inicio de la domesticación de plantas silvestres. Actualmente, el calentamiento global está comprometiendo el futuro de la biodiversidad bajo diferentes escenarios de cambio climático global (Pathak y Abido, 2014). Mediante la conservación de la biodiversidad, se puede asegurar la supervivencia de muchas especies y recursos fitogenéticos para las generaciones futuras. Por lo cual, la biotecnología tiene actualmente un impacto impresionante en la caracterización, utilización y conservación de la biodiversidad vegetal. Algunas técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, embriogénesis, organogénesis, crioconservación entre otras, son muy útiles para mantener colecciones de germoplasma vegetal (Olomola *et al.*, 2019).

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos con mayor importancia en escala mundial, gracias a su aporte nutricional y a la variada gama de productos que se pueden obtener. Se sabe que este cultivo se ha visto afectado a causa de la propagación de plagas y enfermedades causadas por su extensa comercialización y su sobre explotación comercial (Bi *et al.*, 2017). En los últimos 150 años, el impacto del ser humano en el germoplasma de vid ha aumentado, provocando la reducción y desaparición de sus recursos genéticos (Schneidee y Raimondi, 2014). Debido a esto, se han buscado alternativas para la preservación del germoplasma de las variedades de vid comúnmente utilizadas en el mercado de exportación. A pesar de ello, las técnicas de conservación de vid aún no son suficientemente eficientes, lo que lleva a la necesidad de buscar nuevos métodos de almacenamiento de su germoplasma (Benelli *et al.*, 2013a).

En este contexto, una eficiente alternativa para su conservación *ex situ* es la crioconservación, que es el almacenamiento de material biológico vegetal en líquidos criogénicos que, en combinación con metodologías *in vitro* es considerada un método adecuado de mantenimiento seguro a largo plazo del material biológico. Esto es debido a que disminuye las actividades metabólicas y con esto puede preservar el potencial de regeneración del material almacenado (Engelmann, 2011a; Ozudogru y Lambardi, 2016). Se sabe, que la célula vegetal responde de manera determinada a las tensiones abióticas subyacentes a la crioconservación. En el protocolo de vitrificación no optimizado, el uso de solución de vitrificación vegetal 2 (PVS2) puede inducir citotoxicidad

química por uso de dimetilsulfóxido y etilenglicol, además de estrés osmótico por el glicerol y la sacarosa (Kim y Lee, 2012b). De igual forma, las lesiones por frío que se pudieran ocasionar y la congelación promueven cambios metabólicos, que pueden conducir a una mayor producción de radicales libres (Ren *et al.*, 2015a). A pesar de que existen varios estudios sobre el comportamiento de la célula vegetal bajo crioconservación, aún no está elucidado completamente el mecanismo molecular que opera en las células de los tejidos crioconservados, por lo que es necesario más estudios a nivel molecular para comprender los mecanismos derivados del criostrés.

Diversos estudios han reportado la expresión de genes en distintas plantas como respuesta a los protocolos de crioconservación. En este sentido, Huang *et al.*, (2018), reportó la sobreexpresión de los genes como ascorbato peroxidasas (APX) y Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD) relacionados con el estrés oxidativo provocado por el tratamiento. Del mismo modo, debido a la detección de señales externas de estrés por crioconservación los genes receptor tipo proteína cinasa (RLKs) y proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPKs) fueron reportados por Ren *et al.*, en 2015. Además, el estudio de Nah *et al.*, en 2016 mencionó que los factores de transcripción, en particular los miembros de la familia WRKY, cumplen un papel fundamental en la respuesta temprana en la cascada de señales de tolerancia involucrada en múltiples tensiones relacionadas con estrés abiótico y la señalización de ácido abscísico, encontrándolos sobre expresados en respuesta a criostrés.

Otros estudios han evaluado la estabilidad genética de plantas recuperadas, y han reportado cambios significativos en su genoma (Wang *et al.*, 2014; García-Coronado, 2015; Lazo Javalera *et al.*, 2016), Sin embargo, son pocos los reportes estudiando la expresión génica debidas a estrés por crioconservación, por lo tanto, se requiere evaluar el efecto de las distintas etapas de los protocolos de crioconservación en los cambios de expresión génica.

Una técnica utilizada para entender los mecanismos de respuesta es el análisis del perfil transcripcional. Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) y las herramientas bioinformáticas asociadas han revolucionado las investigaciones transcriptómicas de plantas, generando o grandes avances en la identificación de las respuestas genéticas involucradas en el estrés biótico y abiótico de (Martin *et al.*, 2013). Cabe mencionar que la mayoría de las respuestas en la expresión génica reportadas han sido estudiadas en respuesta al efecto de los crioprotectores o por el proceso completo de crioconservación (Ren *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2015), por lo que se requiere de más investigación para conocer las respuestas al

congelamiento y descongelamiento. De ahí que en esta investigación se estudió los efectos en la regulación de la expresión génica de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinífera* L.) sometidos a congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación.

2. ANTECEDENTES

2.1. La Conservación de la Biodiversidad y Cultivos Vegetales

El decrecimiento gradual de la biodiversidad vegetal es un problema de importancia mundial. La influencia de la actividad humana en el medio ambiente ha conducido a una degradación de los hábitats naturales, lo que ha provocado una disminución en la diversidad genética (Vaught, 2019). La protección de la biodiversidad es la conservación, restauración y gestión sostenible tanto de la vida silvestre como de los recursos naturales tales como los bosques, agua, cultivos de interés económico y la biodiversidad que contienen. Al promover su conservación, no solo podemos garantizar la supervivencia de muchas especies y hábitats amenazados, sino también garantizar recursos para las generaciones futuras y proteger el bienestar de las funciones de los ecosistemas (Olomola *et al.*, 2019). En las últimas décadas, ha aumentado la necesidad de proteger el medio ambiente manteniendo condiciones de estabilidad económica y desarrollo social. Actualmente, existen algunos campos científicos orientados a adquirir conocimientos y medios técnicos para prevenir, reducir y / o restaurar las pérdidas ecológicas, y formular principios y métodos para proteger la biodiversidad. En este sentido, se están aplicando nuevas tecnologías para evitar la pérdida de material y especies vegetales con importancia agronómica, ecológica y económica, además de especies en peligro de extinción o aquellas susceptibles a enfermedades, condiciones climáticas, plagas o condiciones ambientales que podrían conducir a la muerte de la planta o pérdida de la especie (Rao, 2004). Debido a esto, es importante buscar alternativas para la conservación del germoplasma de las especies vegetales con importancia ecológica, agronómica y económica.

2.2. La Biotecnología en la Conservación de la Biodiversidad Vegetal

La biotecnología es un conjunto de técnicas a través de las cuales los seres humanos modifican los

seres vivos o los utilizan como herramientas. En la actualidad, la biotecnología utiliza la biología molecular para comprender y manipular los mecanismos moleculares de los seres vivos. Los primeros esfuerzos en biotecnología fue la domesticación selectiva de plantas y animales para mejorar su valor alimenticio, así como satisfacer necesidades (Olomola *et al.*, 2019). Además, hoy en día ofrece nuevos medios para mejorar y mantener en lugar de amenazar la biodiversidad. Debido a esto, actualmente es importante para la conservación, evaluación y utilización de la biodiversidad, particularmente para cultivos importantes cumpliendo un papel crucial en el mantenimiento de recursos genéticos o germoplasma vegetal.

2.3. Conservación de Germoplasma Vegetal

El germoplasma vegetal es la diversidad genética de especies vegetales silvestres disponibles en la biósfera para la humanidad. Dicho término, incluye las distintas estructuras vegetales (semillas, células o tejidos) que contienen la información genética suficiente para regenerar una planta completa y con la capacidad para transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra (Bacchetta *et al.*, 2008). Actualmente el germoplasma es conservado en bancos de germoplasma, esta opción de conservación de recursos fitogenéticos puede presentarse en dos tipos, la creación de bancos *in vivo* o en campo es el mas utilizado, debido a que tiene la ventaja de ser de fácil acceso para la comunidad en general y se pueden realizar en su hábitad natural donde regularmente crecen (*in situ*) y fuera de su ambiente (*ex situ*). Sin embargo, en la conservación *in situ*, los recursos están expuestos a factores naturales a los que no están adaptados como sequía, inundación, huracanes, entre otros (Engelmann, 2011b). Por otra parte, un tipo de conservación *ex situ* es el banco de germoplasma es mediante la conservación *in vitro*, la cual posibilita preservar gran diversidad genética utilizando espacios relativamente pequeños, a un costo modesto y por grandes periodos de tiempo (Withers y Engels, 1990). Este tipo de conservación se puede clasificar según su duración, en corto o largo plazo. En el primero generalmente se emplean técnicas fomentando el crecimiento reducido mediante condiciones específicas enfocadas en retrasar el desarrollo del cultivo aumentando los intervalos de subcultivo, logrando almacenar recursos fitogenéticos hasta por 12 meses. Por otro lado, en el segundo se utiliza principalmente la crioconservación, es decir,

la conservación se realiza mediante exposición del tejido a temperaturas ultra bajas, en donde, la actividad los fenómenos químicos y actividad metabólica se reducen, causando que el material vegetal pueda almacenarse durante periodos ilimitados (Trujillo *et al.*, 2019). En la actualidad, los bancos de germoplasma conservan una amplia gama de tejidos, semillas y plantas enteras; y se han establecido en muchos países para la conservación de plantas y cultivos de interés. (Chauhan *et al.*, 2019).

2.4. Conservación a Largo Plazo: Crioconservación de Plantas

Una alternativa eficiente para la conservación y almacenamiento del germoplasma vegetal *ex situ* es la tecnología de crioconservación. Es un método de seguro para la conservación del material biológico a largo plazo, debido a que no induce alteraciones genéticas, disminuye las actividades metabólicas y preserva el potencial de regeneración del material almacenado (González-Arno y Engelmann, 2013). La crioconservación se refiere al almacenamiento de material biológico (semillas, embriones somáticos/cigóticos, cultivos de callos embriogénicos y organogénicos, yemas, brotes axilares) en líquidos criogénicos, a temperaturas ultra bajas (Ozudogru y Lambardi, 2016). Regularmente se utiliza nitrógeno líquido, que se encuentra a -196°C y se prefiere su uso debido a sus numerosas ventajas, como bajo costo, facilidad de manejo, almacenamiento y no tóxico para las muestras vegetales conservadas (Ozudogru y Lambardi, 2016). Al almacenar las células a una temperatura tan baja, tanto las divisiones celulares como los procesos metabólicos de las células vivas teóricamente se detienen y los materiales vegetales se conservan por tiempo indefinido, manteniendo al máximo su estabilidad genética (Benson, 2008).

2.4.1 Historia de la Crioconservación de Plantas

La crioconservación de plantas tiene su origen de aplicación en 1956 cuando el Profesor Akira Sakai informó por primera vez la supervivencia de un tejido vegetal, después de estar almacenado en nitrógeno líquido, esto fue realizado en brotes inactivos o en dormancia, de ramas de mora

latentes o en ecodormancia, las cuales, se expusieron a una secuencia de temperaturas bajo cero (-10, -20 y -30 °C), lo que resultó en deshidratación por congelación para posteriormente ser sumergidas en nitrógeno líquido. Más tarde, este protocolo se repitió con éxito en ramas de *Salix* y *Populus* (Sakai *et al.*, 1990). Dichos experimentos formaron la base para el protocolo de criopreservación de yemas en dormancia, mismos que en la actualidad siguen siendo utilizados para árboles frutales.

En el año 1960 Quatrano obtuvo por primera vez un protocolo de congelación lenta aplicada a tejidos vegetales. En el protocolo trató a células de linaza con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, posteriormente centrifugó y congeló a -50 °C la muestra, teniendo como resultados una velocidad de enfriamiento del medio de 5-10°C por min. Después, las muestras se almacenaron por un mes a -50° C, y luego las células se descongelaron colocando los tubos en un baño de agua tibia a 40°C. Este experimento demostró la regeneración exitosa de células vegetales aisladas después de una exposición a temperaturas extremadamente bajas. Además, se destacó el potencial de DMSO como un poderoso agente crioprotector para las células vegetales.

En el año 1973, después de numerosa experimentación, se logró una real criopreservación en zanahoria (*Daucus carota*) con NL (Abdelnour, 2001), siendo los primeros en presentar algún protocolo de criopreservación en la década de los ochenta contando con pretratamientos de crioprotectores seguidos de una muy lenta congelación. Dichos protocolos se basaron en deshidratación provocada por la congelación del tejido vegetal y fueron utilizados en especies de climas templados como papa, yuca, naranja, entre otros (Engelmann, 2004).

A los métodos de conservación obtenidos entre los años 1970 y 1980 se les denominó como técnicas de criopreservación clásicas, las cuales consisten en un pretratamiento crioprotector seguido de una congelación lenta, empleando un congelador o aparato de enfriamiento programable (Engelmann, 2004). Entre las sustancias crioprotectores más utilizadas se encuentran el DMSO, manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG). Dichos crioprotectores tienen un papel osmótico, sin embargo, algunos (DMSO) funcionan entrando a las células protegiendo la integridad celular durante el tratamiento de congelación interactuando con el agua. Los procedimientos de criopreservación clásicos se utilizan actualmente para la congelación de tejidos vegetales no diferenciados ya sea suspensiones celulares o callos de plantas (Engelmann, 2004).

Rall y Fahy (1985) lograron con éxito la criopreservación de embriones de ratón exponiéndolos a una solución de vitrificación altamente concentrada de DMSO, acetamida, propilenglicol, y PEG, seguida de un enfriamiento rápido. Estos resultados motivaron que Uragami *et al.* (1989) adoptaran

la técnica con la finalidad de preservar tejidos vegetales. Para los 90's diversas investigaciones establecieron protocolos basados en la vitrificación (Engelmann, 2004). Por ejemplo, en el año 1990, Fabre y Dereuddre desarrollaron por primera vez el protocolo de encapsulación deshidratación de yemas de *Solanum tuberosum*, posteriormente ese protocolo se aplicó a cultivos de yemas, embriones y células en suspensión de varias especies de plantas.

Con estos avances se dió paso al surgimiento de las técnicas nuevas o modernas de crioconservación, las cuales están basadas en la vitrificación, que provoca la transición de agua a una fase vítrea o amorfa en donde se evita la creación de cristales de hielo; este método es considerado mejor que la anterior ya que no requiere de congelación lenta y es apta para un abundante rango de material vegetal (Díaz, 2015).

En los últimos años, se ha desarrollado el método de crioconservación utilizando crioplacas D-V (por sus siglas en inglés droplet-vitrification). La investigación de este nuevo y sencillo protocolo de crioconservación comenzó en el año 2009, cuyo objetivo principal era que las yemas vegetales se crioconservaran adhiriéndolas a un portador o placa y que cada paso del protocolo de crioconservación se realizara con este objeto. Durante el experimento, el enfriamiento y calentamiento se realizó mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido (NL) y la solución de descarga, respectivamente, lo que resultó en el nuevo crecimiento de la planta después de la crioconservación (Tanaka *et al.*, 2018). Actualmente, existen más de 50 publicaciones científicas de técnicas de crioconservación exitosa utilizando el método de crioplacas D-V para una amplia variedad de especies de plantas (Panis, 2019). Para la crioconservación de tejidos vegetales diferenciados como ápices, órganos, yemas, embriones somáticos y cigóticos, se siguen desarrollando nuevas metodologías. Se continúan perfeccionando protocolos buscando ventajas de simplicidad y aplicación en las técnicas, en comparación con los procedimientos clásicos, para una gama amplia de genotipos y tejidos (Engelmann, 2004).

2.4.2 Tejidos Utilizados en la Crioconservación de Plantas

Actualmente, se puede crioconservar una amplia variedad de tejidos y órganos vegetales, incluidos semillas, suspensiones celulares, polen, cultivos embrionarios, somáticos, puntas de brotes, brotes latentes (Engelmann, 2011b; Benelli *et al.*, 2013b; González-Arno y Engelmann, 2013). Uno de

los factores a considerar, es la elección del propágulo a utilizar para el almacenamiento criogénico. La utilización de semillas y embriones logra proteger la diversidad de especies, mientras que utilizando yemas y brotes latentes se puede mantener genotipos específicos. Otra consideración importante es el protocolo a utilizar, ya que el tamaño del explante, la condición fisiológica y la aclimatación al estrés osmótico o las condiciones de frío son importantes para el buen resultado de un protocolo (Reed, 2017).

Las técnicas de crioconservación han evolucionado y mejorado constantemente con el paso de los años. Sin embargo, se requiere cumplir con precauciones para lograr una crioconservación exitosa. El contenido de agua de las células durante la inmersión en el NL es el factor más crítico que afecta el éxito de la técnica (Ozudogru y Lambardi, 2016).

2.4.3 Características Biofísicas de la Crioconservación

El agua, siendo el solvente biológico de la naturaleza, influye en la supervivencia de los tejidos vegetales después de un almacenamiento en NL. Siendo una compleja molécula de comportamiento anómalo, sus características son importantes durante la crioconservación, el agua cuenta con propiedades especiales como sus características polares, electrostáticas, amortiguadoras, cohesivas, solventes y estabilizadoras térmicas (Benson, 2008).

La temperatura es uno de los factores que influye en la formación de los cuatro estados más comunes del agua: líquido, sólido, vítreo y vapor (Pukacki y Juszczyk, 2015). El mayor obstáculo en la crioconservación de cualquier célula es la formación de cristales de hielo intracelulares durante la congelación y descongelación. La excesiva formación de cristales conduce a la muerte celular debido al daño que se genera en las membranas celulares y los orgánulos (Sakai *et al.*, 2008).

Una opción para prevenir la formación de cristales de hielo consiste en congelar las células rápidamente causando que los cristales formados no puedan causar un daño significativo debido a que no son lo suficientemente grandes (Sakai *et al.*, 2008). Otro método utilizado es la previa deshidratación osmótica, ya que, la desecación de células minimiza la formación de cristales de hielo, reduce el tamaño de las células, aumenta la concentración de solutos, a su vez, aumenta la

viscosidad del citoplasma y mejora la estabilidad (Verhoeven *et al.*, 2018). Por lo anterior, para el desarrollo de protocolos de crioconservación se requiere una comprensión del comportamiento del agua, la posible criolesión y la crioprotección.

2.4.4 Protocolos de Crioconservación de Tejidos Vegetales

Lograr el éxito en la crioconservación depende en gran medida de protocolos bien desarrollados e implementados. El objetivo principal de los protocolos criogénicos es lograr una crioconservación exitosa, mediante el control del agua en sus estados líquido, vítreo y sólido, para evitar la formación de cristales de intracelulares letales (Pukacki y Juszczak, 2015).

Los protocolos desarrollados deben especificar el tipo de material vegetal utilizado, los crioprotectores, el tamaño de los propágulos, los pretratamientos, los procedimientos de enfriamiento, recalentamiento, tipo de vial utilizado, las condiciones y procedimientos de regeneración. La mayoría depende de tejidos específicos y requisitos detallados para un cultivo *in vitro* o tratamientos de pre-crioconservación (Reed, 2017).

Principalmente, los protocolos exitosos de crioconservación se centran en la reducción controlada del contenido de agua en la célula a niveles suficientemente bajos para que se concentren los solutos internos y se vuelva altamente viscoso, promoviendo la probabilidad de que se produzca vitrificación en mayor medida en lugar de la formación de cristales de hielo (Benson, 2008).

Cabe mencionar que para la obtención de un protocolo idóneo de crioconservación es necesario, conocer de las propiedades fisicoquímicas del tejido a utilizar, debido a que el proceso se ve afectado por variables como tipo, especie y estadio de la célula a congelar (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Se requiere una atención cuidadosa de todos los pasos del protocolo ya que cada uno de ellos si no es optimizado adecuadamente puede tener un impacto significativo en la recuperación de las células o tejidos vivos. Cada paso en el protocolo de crioconservación tiene una función específica e importante, desde la elección del explante hasta la criocongelación incluyendo el descongelamiento y la regeneración (Reed, 2017). Algunos de los protocolos de crioconservación más utilizados en tejidos vegetales se mencionan a continuación:

2.4.4.1 Vitricación. La vitricación ocurre cuando el agua intracelular de la célula vegetal se convierte a un estado congelado, vítreo, evitando así la formación de cristales de hielo letales durante el proceso de congelación/descongelación. Generalmente el procedimiento de vitricación incluye principalmente pre-cultivo, osmoprotección, deshidratación con solución de vitricación, enfriamiento rápido y calentamiento rápido (Sakai et al., 2008). La metodología se basa en que los tejidos a crioconservar son sometidos a una serie de pre-tratamientos. Los procedimientos fundamentales de vitricación utilizan soluciones de vitricación de Plantas (PVS: por sus siglas en inglés Plant Vitrification Solution). Las más utilizadas son: la solución de vitricación vegetal 2 (PVS2) la cual está compuesta por 30% de glicerol, 15% de dimetilsulfóxido, 15% de etilenglicol y una solución de sacarosa al 0,4 M (Sakai et al., 1990). Otra es la solución de vitricación vegetal 3 (PVS3) conformada por 50% de glicerol y 50% de sacarosa (Nishizawa et al., 1993).

Las soluciones crioprotectoras presentes en la técnica de vitricación funciona en su mayoría penetrando la célula (intracelular), sin embargo, algunos componentes de las soluciones no pueden penetrar la célula (extracelular). Las mezclas de dichas soluciones conceden a la célula una protección total. Después de los pre-tratamientos con soluciones vitrificantes, las muestras se sumergen directamente en NL o en ocasiones se realiza un descenso controlado y lento de la temperatura (Ozudogru y Lambardi, 2016). Por otro lado, hay aspectos importantes que se deben considerar en este método, primeramente, el hecho de que algunos componentes de las soluciones vitrificantes pueden causar algún tipo de estrés en el tejido, como lesiones osmóticas y estrés por deshidratación, debido a que algunos componentes son tóxicos para las plantas, por lo que es necesario controlar el tiempo de exposición a ellas de acuerdo al tipo de explante y su tamaño (Uchendu *et al.*, 2016).

2.4.4.2 Encapsulación-deshidratación. Este procedimiento se basa en una deshidratación osmótica celular y en la tecnología de formación de semillas artificiales, donde los tejidos son encapsulados con alginato de calcio, deshidratados y congelados rápidamente en NL. La función de la encapsulación de los explantes es permitirles pasar por el proceso con afecciones mínimas. Durante el procedimiento, los explantes encapsulados se precultivan en un medio de cultivo líquido con alta concentración de sacarosa (González-Arno y Engelmann, 2013).

Dos pasos fundamentales de esta técnica son cuando el explante se coloca en una matriz base de

alginato de sodio. Misma matriz se entrecruza con cloruro de calcio, lo que forma la cápsula de gel rodeando el crioprotector y el explante, usualmente sacarosa, la cual se utiliza a concentraciones altas (0,5 M a 1,5 M). Seguido de esto, el explante se somete a una corriente de aire controlada utilizando campana de flujo laminar o se introduce a un desecador con sílica gel para reducir su humedad (Sakai *et al.*, 2008). Finalmente, se sumerge la cápsula en NL mediante una disminución lenta de temperatura o una inmersión rápida (Sakai *et al.*, 2008).

Esta técnica es una de las más eficientes. Una de sus ventajas es la fácil manipulación de los explantes debido a su encapsulación. Además, es una de las más utilizadas en protocolos de crioconservación, por la seguridad de protección del explante (Ozudogru *et al.*, 2010).

2.4.4.3 Encapsulación-vitrificación. Una interesante variante de la encapsulación-deshidratación es la encapsulación-vitrificación, donde el utilizar soluciones vitrificantes después de la encapsulación posibilita evitar dos pasos; la deshidratación y la desecación en sílica gel (Ozudogru y Lambardi, 2016). Este método se basa en encapsular los explantes en perlas de alginato de calcio y posteriormente se someten a vitrificación y sumergen en NL directamente (Yang *et al.*, 2020). Actualmente este método es uno de los más utilizados en la crioconservación tradicional. Algunas de sus ventajas es que presenta un 30 % extra en recuperación al compararla a las técnicas de encapsulación o vitrificación individualmente; debido a que las cápsulas de alginato ayudan a disminuir significativamente la toxicidad de las soluciones crioconservantes incrementando ampliamente la seguridad de los explantes congelados (Yang *et al.*, 2020). Los estudios han demostrado que la encapsulación de las células es la mejor opción para la conservación de las células a largo plazo en comparación con la vitrificación no encapsulada. También brinda conveniencia en el manejo de las células durante la dilución y rehidratación usando una solución de sacarosa (Nakkanong y Nualsri, 2018).

2.4.4.4 Crioplacas V-D. El método de crioplacas puede considerarse como un método híbrido entre la gota de vitrificación y la encapsulación-deshidratación. En cada paso de estos métodos se utiliza un portador o placa de aluminio, para disminuir la posibilidad de dañar y perder explantes, además, los explantes pueden tratarse eficientemente con cualquier pretratamiento, ya que, estando en las

placas no flotan en las soluciones ni se adhieren a la pared de los tubos (como en los métodos anteriores en criotubos). Las crioplacas utilizadas están diseñadas con una longitud de 37 mm, un ancho de 7 mm y un espesor de 0,5 mm con 10 pocillos. Su tamaño está diseñado para poder ser introducidos en criotubos de 2 mL. Las crioplacas están constituidas con aluminio grado A1050, siendo la pureza del aluminio superior al 99,5%, son duras, reutilizables y con una alta conductividad térmica, ideales para utilizarse con cualquier explante durante el método de criopreservación y disminuir su daño (Jitsopakul *et al.*, 2019).

Este método incluye pasos similares a los otros métodos de criopreservación. Primeramente, el tejido vegetal se encapsula en pequeñas gotas de alginato que se unen a una placa de aluminio que cabe en un criotubo de 2 mL. Niino y Arizaga en 2015 reportan que posterior a la osmoprotección, el material se deshidrata en una cabina de flujo de aire laminar en el caso del método de crioplaca D (crioplaca-deshidratación) o mediante el uso de una solución de vitrificación en el caso de la crioplaca V (crioplaca-vitrificación).

Entre las ventajas del método de crioplacas se encuentran que es un procedimiento fácil de usar y garantiza mayores tasas de enfriamiento y calentamiento de los explantes tratados. Sin embargo, el método V-D requiere de una manipulación hábil de los explantes e incluye pasos difíciles, como tratamientos osmoprotectores y de deshidratación, transferencia de los tejidos en tiras de papel de aluminio y transferencia en crioviales (Niino y Arizaga, 2015). Cabe mencionar, que en cualquiera de los métodos mencionados el exponer los explantes a temperaturas tan bajas puede provocar diferentes efectos secundarios en el tejido.

2.4.5 Efectos de la Criopreservación de Tejidos Vegetales

A lo largo del procedimiento de criopreservación los tejidos de las plantas son expuestos a diversas condiciones como la deshidratación, el estrés osmótico, oxidativo y congelamiento. Si las condiciones no son las adecuadas, el exponer el tejido vegetal a estas condiciones traerá consigo consecuencias químicas afectando el metabolismo, la estabilidad de la membrana, formación de cristales de hielo, entre otras (Panis, 2019). Debido a lo anterior, para una criopreservación exitosa, están involucrados muchos factores, como el estado de la planta fuente, los explantes de partida, el

personal, las condiciones de cultivo, las condiciones previas al tratamiento, los métodos de criopreservación, las instalaciones criogénicas, los regímenes y la descongelación posterior (Kalaiselvi *et al.*, 2017). Sin embargo, la deshidratación-vitrificación con PVS2 es un paso importante que puede causar un daño considerable en las células de la planta, independientemente de los demás procedimientos criogénicos (Wang *et al.*, 2014). En relación con lo anterior, algunos informes indican que las células de la planta adquirieron tolerancia al tratamiento con la solución PVS2 y las protegen del enfriamiento en NL (Wang *et al.*, 2014). Cabe mencionar que existen estudios donde específicamente se analiza el efecto de la utilización de crioprotectores como PVS2 y PVS3 en la regeneración vegetal posterior de criopreservación, con la finalidad de tener la metodología óptima de conservación (Wang *et al.*, 2019).

También el procedimiento de criopreservación puede causar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones de la estructura celular, cambio en el estado del agua, regeneración a partir de lesiones por criopreservación y cambios genéticos y epigenéticos. A pesar del daño probable de los tratamientos crioprotectores, muchos tejidos vegetales no sobreviven a la exposición en NL sin la crioprotección (Wang *et al.*, 2014).

La célula vegetal responde de manera determinada a el estrés abiótico subyacentes a la criopreservación. Se ha reportado que, en el protocolo de vitrificación, la deshidratación de las muestras con la solución PVS2 pueden inducir citotoxicidad química (principalmente DMSO y etilenglicol), además de estrés osmótico (glicerol y sacarosa) (Kim y Lee, 2012).

Del mismo modo, la descongelación es una parte de proceso sencilla, sin embargo, está considerado como el paso más crítico durante la criopreservación (Díaz, 2015). Lo que se busca en la descongelación es impedir la fusión de los cristales de hielo que se formaron durante la congelación, fenómeno llamado re-cristalización donde se podrían crear cristales más grandes de hielo provocando daño en la integridad celular (Mazur, 1984). Debido a esto, es importante tomar las medidas de prevención necesarias con la finalidad de recuperar el explante vegetal con éxito. Debido a lo anterior, se requieren estudios complementarios que amplíen el conocimiento sobre el comportamiento de la célula vegetal bajo congelamiento y descongelamiento en la criopreservación, que determinen a nivel molecular los mecanismos del criostres y/o la criolesión y cómo las plantas responden a varios tipos de estrés abiótico.

2.4.5.1 Análisis de efectos moleculares (transcriptómica) de la crioconservación en plantas. Las respuestas bioquímicas celulares a los tratamientos de crioconservación en las plantas son poco conocidas. El campo de la criobiología vegetal busca comprender los procesos moleculares y fisiológicos que permiten a las plantas sobrevivir a la crioconservación (Volk *et al.*, 2011). La crioconservación de las plantas es difícil debido a sus procesos biológicos complicados, compleja actividad metabólica y respuestas sensibles al estrés (Ren *et al.*, 2015a).

El conocimiento de la forma de regulación del transcriptoma es primordial para el entendimiento de los diferentes constituyentes moleculares que integran una red de respuesta ante un evento inductor. El actual desarrollo de RNA-seq como herramienta para la transcriptómica, permite la secuenciación masiva de ARN, haciendo posible conseguir perfiles de expresión génica como respuestas de defensa, ofreciendo posibilidades de profundizar el entendimiento de mecanismos activados o regulados como respuesta en las plantas al estrés, permitiendo identificar y cuantificar nuevos o conocidos transcritos cumpliendo una función en la defensa del tejido vegetal (Soto-Sedano y López-Carrascal, 2012). Así mismo, mediante el estudio del transcriptoma se pueden identificar genes que se inducen o reprimen y su probable participación en rutas de señalización y reconocimiento como consecuencia del tratamiento de crioconservación. Esto con la finalidad de ayudar a establecer un protocolo adecuado para la crioconservación.

2.4.5.2 Cascada de señalización y percepción de señales de estrés. El estrés abiótico en la célula vegetal inicia generalmente con una señalización rápida para que la célula pueda responder. Existen diversos miembros de los receptores de proteínas de membrana que perciben el estrés abiótico (Penfield y MacGregor, 2013), se ha planteado la hipótesis de que las alteraciones mediadas por la temperatura en la fluidez/rigidez de la membrana pueden ser la detección primaria de una percepción del estrés, por el estímulo de temperatura (Guo *et al.*, 2017).

Los receptores de proteínas de membrana conducen señales fisicoquímicas a través de sus dominios de cinasas citosólicas, como HKS (histidina quinasa) y RLK (quinasas similares a receptores) (Zhu, 2016). Así mismo, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) conocidas como MAP cinasas, juegan un papel clave en la integración de varias señales de estrés abiótico en las células vegetales (Zelicourt *et al.*, 2016). Por ejemplo, Ren *et al.* (2015) durante su protocolo de crioconservación encontraron a los genes inducidos relacionados con la osmoprotección HKs y MAPKKK13.

Reportando que, en las plantas, las HK sensoriales participan en la percepción de estrés por sequía, osmótica, frío y sal.

El calcio es conocido como segundo mensajero, ya que la entrada de Ca^{2+} en el citosol es una de las primeras consecuencias de la detección del estrés, particularmente ocasionado por temperatura (Sinha *et al.*, 2015). Los tres principales sensores de Ca^{2+} en las plantas son la calmodulina (CaM) en conjunto con proteínas similares a la calmodulina (CML), las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPK) y las proteínas similares a la calcineurina B (CBL). Dichas proteínas han demostrado participar en las redes de transducción de señales (Yang *et al.*, 2020). Las diversas quinasas dependientes de calcio (Ca^{2+}) (CDPK / CPK) regulan la respuesta al ácido abscísico (ABA) en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2018). Primeramente, se descubrió que la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) por receptores desconocidos que da como resultado la generación de señales de Ca^{2+} , posteriormente se obtuvo que la proteína de unión al calcio se sobreexpresaba en las técnicas de crioconservación, finalmente la señal de ROS se transmitía a la serina/treonina proteína cinasa (Zhu, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Además, como consecuencia de las señales de Ca^{2+} , los CBP experimentan un cambio conformacional que les permite interactuar y regular (activar o inactivar) proteínas diana (Defalco, 2017).

Estos tipos de estrés abiótico también están presentes en la crioconservación de plantas que inducen respuestas adaptativas al reprogramar la expresión génica. Cuando se expone a la deshidratación, la señal de estrés osmótico y de congelación debe ser percibida y transmitida al núcleo; en este aspecto, los componentes ubicados en la membrana celular primero deben detectar y amplificar la señal. La primera reacción de células vegetales es muy importante para definir la defensa celular a utilizar para evitar el estrés abiótico (Ren *et al.*, 2015).

La regulación positiva de los receptores de membrana celular ocurre en una etapa temprana porque actúan como un transductor de señal importante y es inducible en respuesta a ABA y ROS, sal y estrés por sequía (Sinha *et al.*, 2015). Por esa razón, la regulación positiva de los componentes de la membrana celular está relacionada con funciones iniciales en la percepción y transducción de señales.

2.4.5.3 Factores de transcripción y transducción de señales ROS. Otros mecanismos de defensa en las plantas después de la sensación de estrés son la acción de los factores de transcripción que

actúan directamente sobre la inducción o represión de la expresión génica. Los factores de transcripción, particularmente los miembros de la familia MYB y WRKY, juegan un papel importante en la respuesta temprana en la cascada de señales de estrés. Estos genes están involucrados en una amplia gama de tensiones abióticas y señalización a ácido abscísico (ABA) (Baldoni *et al.*, 2015). Se sabe que WRKY promueve la expresión de proteínas PR (proteínas relacionadas con patogénesis) o proteínas anticongelantes en respuesta al estrés abiótico (Naing y Kim, 2019).

Se ha reportado que la familia de factores de transcripción WRKY se expresan diferencialmente en vid tras la condición de estrés por frío (Guo *et al.*, 2017). Las células vegetales detectan ROS a través de tres mecanismos que son: las proteínas receptoras ROS no identificadas, los factores de transcripción sensibles a redox y la inhibición directa de fosfatasa por ROS (Miller *et al.*, 2018). Ren *et al.* (2015) crioconservaron *Arabidopsis thaliana* y encontraron un aumento en los niveles de ROS y peroxidación después de un rápido calentamiento y enfriamiento en NL. Mediante la hibridación de microarreglos, descubrieron que el aumento en la regulación génica de DREB/CBF era beneficioso para hacer frente a la lesión criogénica, también los miembros de la familia OX11, WRKY y MYB como factor clave en la transducción de señales de ROS activaron las redes productoras de ROS y de barrido de ROS, incluyendo ciclos AsA-GSH y GPX involucrados en la eliminación de H₂O₂.

Actualmente, el desarrollo de tecnologías de secuenciación ha abierto oportunidades para el análisis de plantas con y sin un genoma secuenciado. Permite estimar la expresión génica a nivel de transcritos, y comprender la dinámica transcriptómica es fundamental para identificar la función del gen y las variaciones fenotípicas para una amplia variedad de preguntas biológicas. En el campo de la crioconservación de plantas, existen pocos reportes al respecto, sin embargo, en hierba de cordón de la pradera (*Spartina pectinata*) se estudió el transcriptoma en respuesta al estrés por congelación utilizando el método de secuenciación de ARN para realizar un perfil de expresión génica. Encontraron genes regulados positivamente implicados en la modificación de la membrana plasmática, la señalización mediada por calcio, las proteínas relacionadas con el proteosoma y los reguladores de la transcripción (MYB y WRKY). La segunda respuesta fue de genes involucrados en la codificación de ADN y las proteínas de reparación del daño celular (Nah *et al.*, 2016).

2.4.5.4 Respuestas de vías metabólicas. Posterior a la señalización en respuesta a la detección de estrés en la célula vegetal ocurre la activación de rutas metabólicas. Existe actualmente información sobre los efectos causados por la utilización de los crioprotectores y a consecuencia del proceso completo de criopreservación, en donde se reporta en su mayoría respuestas por daño oxidativo y estrés osmótico, (Volk *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2015a; Huang *et al.*, 2018). Sin embargo, se requiere una mayor profundización de estudios en la etapa del congelamiento y descongelamiento del proceso de conservación utilizando nuevas tecnologías de secuenciación masiva disponibles.

2.5. Importancia del Cultivo de Vid (*Vitis vinifera* L.)

La vid (*Vitis vinifera* L.) es considerada uno de los cultivos con mayor importancia a nivel mundial, gracias a su aporte nutricional y a gran variedad de productos que se pueden obtener a través de su cosecha (Bi *et al.*, 2017). En el año 2020 se produjeron en México más de 465 mil toneladas, cosechadas en más de 34 mil hectáreas a lo largo del país, traduciendo a un rendimiento de 13 toneladas por hectárea. De esta producción el país exportó el 65% de la producción total del fruto a 13 países, principalmente Estados Unidos, Australia y Japón (SIAP, 2020). Los principales estados productores son Sonora con el 75.27% del total, seguido de Zacatecas con el 14.3%, Baja California con 5.45% y Aguascalientes con un aporte del 2.51%. Es decir, 3 de cada 4 racimos de uva producida en México provienen de Sonora (SIAP, 2020). Siendo Sonora líder en producción de uva aportando un valor de más de seis mil millones de pesos (SADER, 2019), a nivel municipal destacan Hermosillo y Caborca donde se han producido más de la mitad de la producción total nacional (55%) (SIAP, 2020). Sonora produce uva en cuatro diferentes modalidades: como uva de mesa en un 92 %, como uva industrial que se emplea como un subproducto en la elaboración de muchos otros productos en un 3.7 % y uva pasa en un 3.3 % (SAGARHPA, 2018).

Sin embargo, la propagación de plagas y enfermedades causadas por la comercialización, la sobreexplotación del cultivo en los últimos 150 años, el impacto del hombre en el germoplasma del cultivo de vid ha aumentado, provocando la reducción y desaparición de los recursos genéticos del cultivo (Schneidee y Raimondi, 2014). Debido a esto, se han buscado alternativas para la preservación del germoplasma de las variedades de vid comúnmente utilizadas en el mercado de

exportación con la finalidad de tener conservada esta especie vegetal por un largo periodo de tiempo y así preservar para las siguientes generaciones este recurso de gran importancia agronómica comercial regional y nacional.

2.5.1 Estudios de Crioconservación de Vid (*Vitis vinifera* L.)

La disponibilidad y el fácil acceso a diversas especies de *Vitis* son requisitos previos para los avances en los programas de producción. Los bancos de genes de plantas generalmente mantienen la vid en colecciones o repositorios de campo, mismas que son vulnerables al estrés biótico y abiótico. Por ello, la crioconservación se ha considerado un método ideal para preservar estas colecciones y poder contar con copias de seguridad rentables económicamente (Bettoni *et al.*, 2019). A pesar de las ventajas de este método, el crio-almacenamiento de vid no se ha implementado completamente dentro de los bancos de genes.

Se han reportado resultados limitados con las yemas en dormancia de *Vitis* crioconservadas con la técnica de encapsulación-deshidratación por Esensee *et al.* (2019). En los siguientes años se realizaron otros trabajos con la misma técnica, surgiendo varios desafíos para la ciencia. Actualmente, diversos métodos con altos niveles de viabilidad se han desarrollado para *Vitis*, incluyendo encapsulación-deshidratación, vitrificación, encapsulación-vitrificación, las gotas-vitrificación y crioplasmas con la finalidad de erradicar virus en las plantas (Volk *et al.*, 2011; Bettoni *et al.*, 2016, 2019; Bi *et al.*, 2017). García-Coronado *et al.* en 2016 reportaron un protocolo de vitrificación para la crioconservación de embriones cigóticos, obteniendo en su estudio una regeneración entre 30-75%. Algunos avances en este aspecto se muestran en el **Cuadro 1** cuya información se obtuvo de Bi *et al.*, del 2017.

Cuadro 1. Información de Estudios de Crioconservación en Vid

Explante	Protocolo de Crioconservación	Especie	% Viabilidad	Referencia
Yemas	Inmersión Directa en Nitrógeno Líquido	<i>V. vinifera</i>	0	(Esensee <i>et al.</i> , 2019)
		<i>V. riparia</i>	Bajo	
		<i>V. amurensis</i>	Bajo	

	Encapsulación-Deshidratación	<i>V. vinifera</i>	29	(Zhao <i>et al.</i> , 2001)
		<i>V. vinifera</i>	36	(Zhai <i>et al.</i> , 2003)
		<i>V. vinifera</i>	49	(Wang <i>et al.</i> , 2000)
		<i>V. vinifera</i>	63	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
		<i>V. vinifera</i>	62	
		<i>V. vinifera</i>	59	(Bayati <i>et al.</i> , 2011)
	Encapsulación-Vitrificación	<i>V. berlanderi</i>	Bajo (No específica)	(Benelli <i>et al.</i> , 2013a)
	Vitrificación	<i>V. vinifera</i>	65.5	(Matsumoto y Sakai, 2003)
		<i>V. berlanderi</i>	46.7	
		<i>V. mourvedre</i>	75	
		<i>V. coigneae</i>	75	
		<i>V. vinifera</i>	45	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
		<i>V. vinifera</i>	59	
		<i>V. vinifera</i>	55	(Shatnawi <i>et al.</i> , 2011)
		<i>V. vinifera</i>	43	(Hassan y Haggag, 2013)
		<i>V. vinifera</i>	57	(Lazo-Javalera <i>et al.</i> , 2015)
	Vitrificación en gotas	<i>V. vinifera</i>	45	(Marković <i>et al.</i> , 2013)
		<i>V. vinifera</i>	50	
		<i>V. vinifera</i>	30	
<i>V. vinifera</i>		46	(Marković <i>et al.</i> , 2014)	
<i>V. vinifera</i>		50	(Bi <i>et al.</i> , 2017)	
<i>V. pseudoreticulata</i>		30		
Tejido Embriogénico o Somático	Encapsulación-Deshidratación	<i>V. vinifera</i>	78	(Wang <i>et al.</i> , 2002)
		<i>V. vinifera</i>	23	(Gonzalez-Benito y Vidal, 2009)
		<i>V. vinifera</i>	51.5	(Ben-Amar <i>et al.</i> , 2013)
		<i>V. berlanderi</i>	78	
	Encapsulación-Vitrificación	<i>V. berlanderi</i>	76	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
		<i>V. vinifera</i>	61-8	
		<i>V. vinifera</i>	48	(Vasanth y Vivier, 2011)
Vitrificación	<i>V. vinifera</i>	60	(Miaja <i>et al.</i> , 2004)	
Semilla	Inmersión Directa en Nitrógeno Líquido	<i>V. vinifera</i>	60	(Hassan <i>et al.</i> , 2013)

Con base en la información anterior, la mayoría de las investigaciones alrededor de la crioconservación en vid se enfoca en regeneración, sin embargo, se requiere de una mayor

investigación y profundizar en el análisis de la expresión de genes involucrados en la congelación y descongelación durante la crioconservación para entender y conocer la regulación génica del proceso para optimizar el protocolo de vitrificación de vid en el cual se garantice la fidelidad de los tejidos conservados incluyendo la estabilidad genética con mínimos cambios a nivel molecular en su germoplasma.

3. HIPÓTESIS

El análisis transcriptómico de los embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) criopreservados por vitrificación con PVS2 permite conocer las rutas, procesos biológicos y genes involucrados en la respuesta del tejido vegetal al congelamiento descongelamiento.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el perfil de expresión de genes en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) en respuesta al congelamiento/descongelamiento durante el procedimiento de crioconservación por vitrificación.

4.2. Objetivos Particulares

Secuenciar el transcriptoma de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservados mediante herramientas de secuenciación Illumina NextSeq 500.

Identificar genes expresados diferencialmente y rutas metabólicas relacionadas mediante herramientas bioinformáticas.

Diseñar y evaluar *in silico* cebadores para genes expresados durante el estrés de crioconservación.

Validar mediante la cuantificación por qRT-PCR de la expresión de genes específicos seleccionados de embriones cigóticos de vid crioconservados utilizando ARN total.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Vegetal

Se obtuvieron muestras de uva (*Vitis vinifera*) cv. Red Globe del Mercado de Abasto y establecimientos locales en Hermosillo, Sonora, México. Cada racimo se lavó con agua y jabón, después se almacenó en refrigerador a 4° C por 7 días. Posteriormente, se extrajeron las semillas y se realizó una prueba rápida de viabilidad mediante flotación que consiste en colocar las semillas en un recipiente con agua, descartando las que floten y conservando las que precipitan para los siguientes tratamientos (Hamadina y Ugbede, 2018).

5.2. Protocolo de Desinfección

A las semillas seleccionadas se les realizaron una serie de lavados que consistieron en sumergir las semillas en solución de etanol al 70% en agitación constante durante 5 min, después en hipoclorito de sodio al 1,5% por 15 min y por último tres lavados con agua destilada estéril de 5 min cada uno. Finalmente, las semillas se colocaron en campana de flujo laminar (Esco Airstream®, modelo ASH-3B2, serie 2012-74190, EUA) sobre papel estériles durante 10 min (García-Coronado *et al.*, 2016).

5.3. Maduración del Embrión en Semilla de Vid

Para garantizar la maduración del embrión cigótico en las semillas, posterior al lavado se colocaron en medio MS 100% (Murasnige y Skoog, 1962) con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 oscuridad a 25 °C por 14 días. Al pasar este período, se incubaron en una solución de ácido giberélico a una

concentración de 1 mg/mL, de durante 24 h a 25 ° C antes de realizar extracción del embrión cigótico.

5.4. Extracción del Embrión Cigótico

En una campana de flujo laminar y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Daigger Scientific Inc., modelo Stemi 2000, México) se colocaron las semillas individualmente sobre una placa Petri para la extracción de los embriones cigóticos utilizando un bisturí quirúrgico estéril con cuchilla número 11 (Sensi-Medica). Se obtuvieron 100 embriones y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Cada tratamiento se realizó con al menos dos repeticiones biológicas (Lazo-Javalera *et al.*, 2016).

5.5. Protocolos de Crioconservación

La crioconservación consistió en dos tratamientos, los cuales consistieron en vitrificación (tratamiento 1: PVS2) y vitrificación más nitrógeno líquido y descongelamiento (tratamiento 2: PVS2+NL). La vitrificación se realizó utilizando la Solución de Vitrificación Vegetal Número 2 (PVS2), conformada por glicerol al 30%, etilenglicol al 15% , dimetilsulfóxido al 15% y una solución de sacarosa al 0.4 M en medio MS (Murasnige y Skoog, 1962) a un pH de 5,8 (Sakai *et al.*, 1990). Los embriones se sumergieron en 1 mL de la solución PVS2 al 50% durante 10 min a 25 ° C, seguido de 10 min en PVS2 al 100% a 4 ° C, posteriormente se realizó la extracción de ARN. Por último, para el tratamiento 2, posterior a la vitrificación, los embriones se almacenaron en nitrógeno líquido (NL) por 30 min y se descongelaron a 38 ° C por 3 min, la solución PVS2 se eliminó por completo y se les realizó tres veces lavado con agua destilada esterilizada a cada tubo y se les realizó una extracción de ARN. En total se obtuvieron dos repeticiones biológicas para cada tratamiento: PVS2.1, PVS2.2 y PVS2NL.1 y PVS2NL.2 (el número después del punto en la nomenclatura de los tratamientos indica número de réplica biológica de cada tratamiento).

5.6. Extracción de ARN de Embriones Cigóticos de Vid y Síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo de embriones cigóticos después de cada tratamiento utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), Siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad y concentración de ARN se determinó por espectroscopía UV-vis utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, modelo NanoDropOneC, EUA), un análisis colorimétrico en geles de agarosa al 1% y una foto en documentador MicroDOC Gel Documentation System (Clever Scientific, modelo DI-HD, serie G15-130125066, EUA). Posteriormente, para los análisis de expresión relativa se realizó la síntesis del ADNc utilizando el ARN total según lo indica el kit “SMARTer PCR cDNA synthesis kit” (Clontech Laboratories USA, CA).

5.7. Secuenciación de Transcriptoma

Las muestras de ARN del tratamiento 1 y 2 se utilizaron para la secuenciación del transcriptoma. El tamaño y la calidad del ARN se analizaron por espectroscopía usando Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). La secuenciación se realizó en formato 1 X 75 single-end en el sistema de secuenciación Illumina NextSeq 500 en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV-Irapuato, México). Los datos sin procesar se obtuvieron como archivos FASTQ, que incluyen lecturas y su calidad definida con base a la escala de calidad de PHRED.

5.8. Análisis de Calidad y Filtrado de Lecturas

La calidad de los datos crudos se evaluó utilizando la herramienta FastQC v0.10.0 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), posteriormente utilizando FASTX-Toolkit v0.0.13 (<http://hannonlab.cshl.edu/fastx-toolkit>) se realizó el filtrado de lecturas

obteniendo secuencias de alta calidad ($Q>30$), se descartaron las lecturas que contenían nucleótidos desconocidos ($N> 5\%$) y se eliminaron secuencias menores a 75 pb.

5.9. Alineamiento Contra Genoma de Referencia y Cuantificación del Número de Lecturas

Las lecturas filtradas ($Q>30$) se alinearon al genoma de referencia versión 12X generado por Genoscope (http://www.genoscope.cns.fr/externe/Download/Projets/Projet_ML/data/), para esto se usó el programa Bowtie2 v2.3.0 (<http://sourceforge.net/projects/bowtie-bio/files/bowtie2/2.2.5/>), el genoma fue indexado con “bowtie2-build” y el alineamiento se realizó utilizando la configuración predeterminada con modo “local” y “sensitive”. El número de lecturas asignadas por gen se determinó mediante “htseq-count” del paquete de python HTSeq v0.9.1 (<https://pypi.org/project/HTSeq/>) y los datos de recuento se importaron al entorno informático estadístico R para su posterior análisis.

5.10. Identificación de Genes Expresados Diferencialmente

El análisis exploratorio de las muestras y las réplicas biológicas se realizó mediante un análisis del coeficiente de correlación de Pearson; para esto, los niveles de expresión se normalizaron a RPKM (lecturas por kilobase de transcrito por millón de secuencias cortas), se utilizaron unigenes con $RPKM \geq 0.3$ para los análisis. Mientras que la variabilidad biológica entre muestras se calculó usando correlación de escala multidimensional (MDS) con el paquete estadístico R con datos normalizados en TMM (Media recortada de valores-M).

La identificación de genes expresados diferencialmente se realizó con el paquete Bioconductor edgeR v3.32.1 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), utilizando los archivos de las lecturas generados por HtSeq. Se manejaron conjuntos de datos de genes expresados diferencialmente basados en valores de corte de tasa de error del 5% ($FDR \leq 0,05$) y un logaritmo base 2 de razón de cambio (LogFC) con el valor umbral de > 1 para filtrar los genes expresados de

forma significativa. Los genes que mostraban más del doble de cambios en la expresión se consideraron genes expresados significativamente (DEG).

5.11. Análisis de Enriquecimiento, Distribución de Enzimas y Caracterización de Genes Identificados como Expresados Diferencialmente

Para el análisis de enriquecimiento en los términos de ontología genética los genes fueron identificados y anotados por el software OmicsBox v1.4.11 (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), los términos GO (Ontología Genética) considerados como enriquecidos fueron basados en valores de corte con un nivel de significancia de 1% ($p < 0.01$). La identificación de los términos GO se realizó utilizando el software blast2go como herramienta de OmicsBox. Las anotaciones de la distribución enzimática se realizaron mediante OmicsBox.

5.12. Diseño de Oligonucleótidos Para Genes Seleccionados Respuesta al Estrés por Frio

A partir de los genes identificados utilizando la base de datos EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) se seleccionaron 2 genes reprimidos (VIT_01s0026g02620, VIT_00s0733g00010) y dos inducidos (VIT_01s0146g00320, VIT_04s0008g01550). Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa QuantPrime (<https://quantprime.mpimp-golm.mpg.de/>). Se diseñaron Primers con características específicas para PCR tiempo real, se obtuvo 5 pares de cebadores por cada uno de los genes seleccionados de *Vitis vinifera*. La anotación utilizada para llevar a cabo este punto fue EnsemblGenomes release 14 (genoma +) con el organismo *Vitis vinifera* y el protocolo de cuantificación seguido fue “SYBR Green real-time qPCR” (Sin hits de empalme alternativo).

5.13. Validación de Transcriptoma Mediante Cuantificación de Expresión Relativa Utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Se realizó el análisis de expresión relativa utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) mediante el kit “Luna® Universal qPCR. Master Mix (New England BioLabs Inc.)” en un termociclador ‘StepOne™ Real Time PCR System de Applied Biosystems Thermofisher bajo las condiciones de 40 ciclos de 4 min a 94°C, 15 seg a 94°C y 1 min a 68°C. El ARNm extraído de embriones control (PVS2) se usó como calibrador y el gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *V. vinifera* como gen constitutivo. Para la cuantificación de la expresión del gen constitutivo se usó los oligonucleótidos VvGAPDH-F y VvGAPDH-R) de acuerdo a García-Coronado *et al.*, (2016).

Las condiciones de reacción de RT-PCR fueron las especificadas en el kit “Luna® Universal qPCR. Master Mix (New England BioLabs Inc.)” con 100 ng de oligonucleótidos y 50 ng de ADNc total. La cuantificación se realizó por triplicado técnico y duplicado biológico incluyendo controles negativos sin templado para cada uno de los transcritos evaluados. Asimismo, se construyó una curva de disociación para verificar la especificidad de amplificación de los oligonucleótidos y se analizó la eficiencia de amplificación respecto al gen endógeno para cada uno de los genes seleccionados utilizando metodología de rangos dinámicos con cuatro puntos de dilución, partiendo de 100 ng totales en el punto de dilución mayor y continuando con un factor de dilución 1:5 en los siguientes puntos. Cada dilución se cuantificó por triplicado en muestras independientes

5.14. Métodos Estadísticos

Todos los experimentos presentaron un diseño completamente al azar con al menos 2 réplicas biológicas en cada tratamiento. Los resultados del transcriptoma estadísticamente se consideran como estudios de caso.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción de ARN de Embriones Cigóticos de Vid

A las muestras de ARN de embriones cigóticos de vid se les realizó un análisis de calidad e integridad mediante espectrofotometría. Se sabe que dentro de las características fisicoquímicas del ARN, sus bases nitrogenadas tienen propiedad de absorber luz ultravioleta con una longitud máxima de aproximadamente 260 nm, lo que facilita su identificación y cuantificación (Pérez-Cruz y Gomez-Marin, 2009). Una muestra de ARN que contiene valores de absorbancia A260/280 entre 2.0-2.2 se considera con pureza óptima, >1.7 corresponde a una muestra con pureza aceptable, <1.7 indicaría que la muestra está contaminada con presencia de compuestos aromáticos. Por otro lado en los valores de absorbancia A260/230 una muestra de ARN con pureza óptima corresponde a un valor de 2 o poco superior, la muestra es de pureza aceptable si cuenta con un valor >1.5 (BANCOADN, 2020). Basándose en los valores mencionados anteriormente, las muestras de ARN de los tratamientos con sus respectivas réplicas biológicas cuentan con una pureza óptima para su utilización en ensayos de secuenciación masiva (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Concentración y calidad de muestras de ARN.

Tratamiento	[ng/μL]	260/280	260/230
PVS2.1	88.9	1.99	1.79
PVS2.2	106.5	2.01	1.70
PVS2NL.1	116.8	2.13	2.18
PVS2 NL.2	165.2	2.13	2.09

6.2. Secuenciación de Transcriptoma y Análisis de calidad

La secuenciación del ARN de cada tratamiento y sus réplicas biológicas arrojó un total de 380,455,728 lecturas sin procesar de Illumina “single-end” con una longitud de 75 pb y la calidad

de las secuencias, después de remover adaptadores, filtrando a secuencias de alta calidad ($Q>30$) y descartando las lecturas que contenían nucleótidos desconocidos ($N> 5\%$) se obtuvo aproximadamente 63 millones de lecturas por muestra en secuencias filtradas para los análisis bioinformáticos necesarios.

6.3. Alineamiento Contra Genoma de Referencia y Cuantificación de Lecturas

La alineación de lecturas contra el genoma de referencia en Genoscope de *Vitis vinifera* dió como resultado un alineamiento global del 96.29%, con un promedio de alineado único de 64.86%, mientras que las lecturas que alinearon más de una vez fueron de 31.42 % como se muestra en el **cuadro 3**. Mismos valores que son reflejo de un buen mapeo, considerando aceptable un promedio mayor a 70%.

Cuadro 3. Porcentaje de alineamiento utilizando el programa Bowtie2, $p<0.05$ en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación.

Lecturas alineadas	PVS2.1	PVS2.2	PVS2NL.1	PVS2NL.2
1 vez	64.29%	61.35%	66.32%	67.52%
> 1 vez	31.65%	33.91%	30.27%	29.88%
Tasa de alineamiento	95.94%	95.26%	96.59%	97.40%

Con los datos normalizados de RPKM para analizar la variabilidad biológica presente entre las muestras y los transcriptomas, se estudió la correlación conjunta de los datos, mediante un análisis de escala multidimensional (MDS) (**Figura 1**), en donde se muestra la distribución de los tratamientos diferenciados por colores. Utilizando las replicas biológicas de cada tratamiento (PVS2 y PVS2+NL), se puede observar como los diferentes tratamientos pertenecen a cuadrantes distintos indicando que las muestras son diferentes y comparables, lo que favoreció la continuidad de los análisis bioinformáticos de los datos obtenidos.

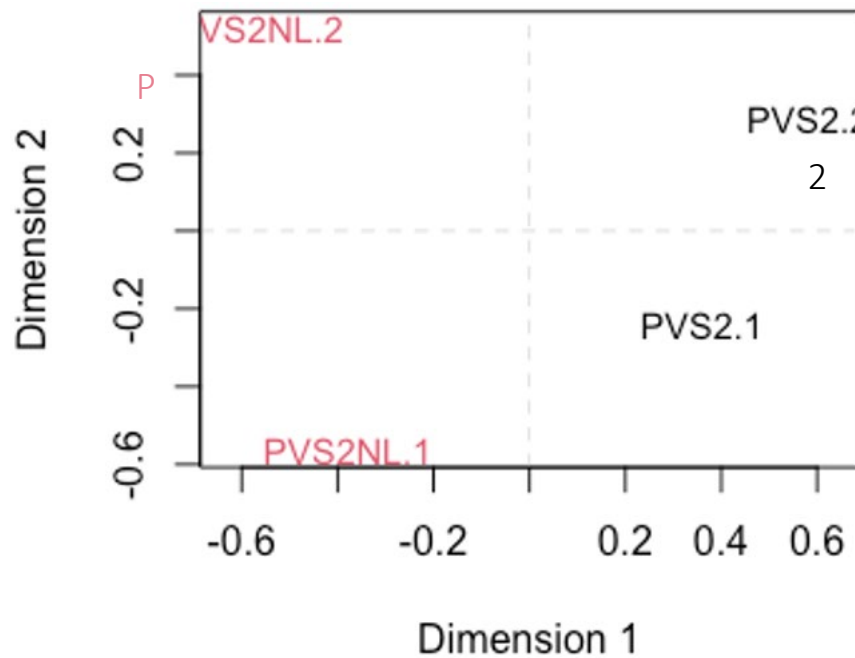


Figura 1. Gráfico de Escalamiento Multidimensional (MDS) comparativo de tratamientos y réplicas de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) expuestos a congelamiento y descongelamiento durante la crioconservación. Cada tratamiento se representa con el mismo color y el número después del punto indica réplica biológica.

Los resultados en el análisis de correlación de Pearson presentaron un comportamiento similar entre las muestras, las cuales contaban con un valor cercano entre ellas, indicando quizás un comportamiento relacionado (**Figura 2**), se obtuvo valores de correlación de Pearson positivos y cercanos a 1, demostrando una correlación positiva y poca diferencia en la expresión genética entre los tratamientos.

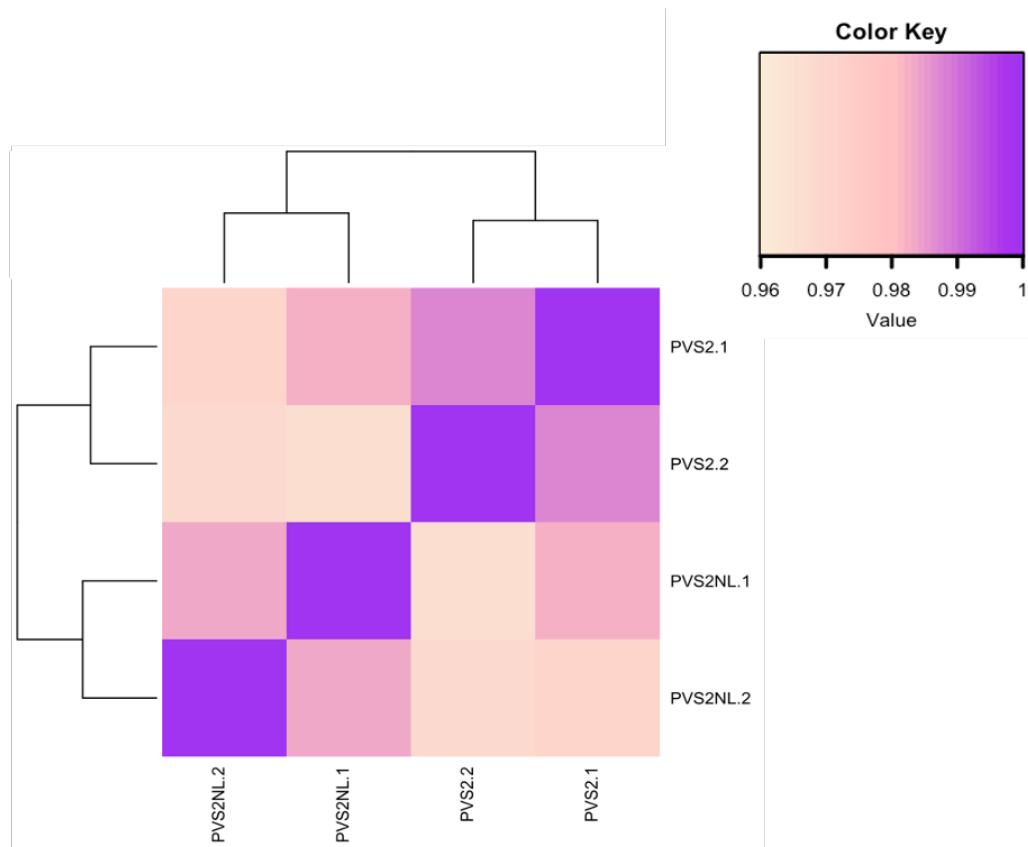


Figura 2. Mapa de calor de la Correlación de Pearson con escala de color. Comparativo de tratamientos y réplicas de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) expuestos a congelamiento y descongelamiento durante la crioconservación.

6.4. Genes Expresados Diferencialmente

Al realizar un análisis de dispersion de Tagwise y el calculo de genes expresados diferencialmente (DEG) se encontraron un total de 229 genes, de los cuales 43 son inducidos y 186 reprimidos. En la **Figura 3** del gráfico de volcán se visualiza la representación Log base 2 del Fold change correspondiente a cada gen frente a Log base 10 de FDR, se pueden observar a colores los genes que mostraron una diferencia estadística significativa ($FDR < 0.05$), en su nivel de expresión ($\text{LogFC} > 1$ y $\text{LogFC} < -1$) por efecto del tratamiento de congelamiento y descongelamiento durante la crioconservación, siendo los puntos de color rosa los genes inducidos y los puntos morados los genes reprimidos.

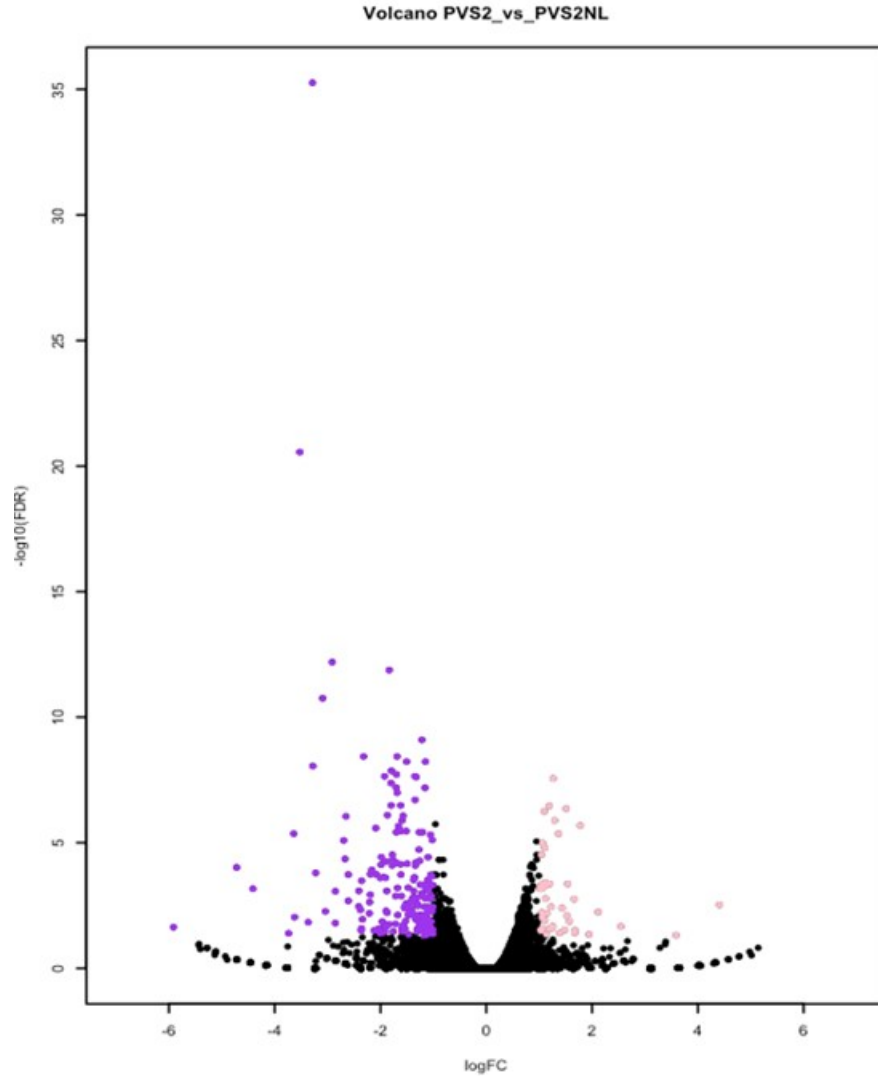


Figura 3. Gráfico de volcán que indica la distribución global de log₂FC (veces el cambio en la expresión génica) y el valor FDR en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento por criopreservación. El conjunto adyacente de puntos representa genes con aumento en su expresión o inducidos (rosas) y genes reprimidos (morados) en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) expuestos a congelamiento/descongelamiento durante la criopreservación.

6.5. Análisis de Enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento o categorización de GO (ontología genética) se realizó para investigar procesos biológicos sobrerrepresentados o funciones moleculares involucradas en los genes que se encontraron expresados diferencialmente. Primeramente, para los genes inducidos,

los resultados mostraron que 3 términos GO en categoría de proceso biológico, 1 dentro de componente celular y 2 en función molecular se enriquecieron significativamente ($p < 0,01$), los términos más enriquecidos fueron el ensamblaje de nucleosomas (10.71%), componente de nucleosomas (10.71%), actividad de reservorio de nutrientes (7.14%), regulación negativa de crecimiento de órganos (3.57%), entre otros (**Figura 4**). Resultados similares se obtuvieron por Yang *et al.* en 2015 al trabajar con planta de plátano bajo estrés por frío donde se mostraron enriquecidos procesos de nucleosoma y ensamblaje de nucleosoma, así mismo en *Dendrobium nobile Lindl* expuesta a nitrógeno líquido por criopreservación se encontraron grupos GO de modificación postranscripcional, proteínas chaperonas, modificación de RNA y estructura y dinámica de cromatinas (Di *et al.*, 2018). Lo que podría indicar que se activan vías para la modificación de la estructura del ADN y aumenta la producción de proteínas en respuestas a estrés como chaperonas.

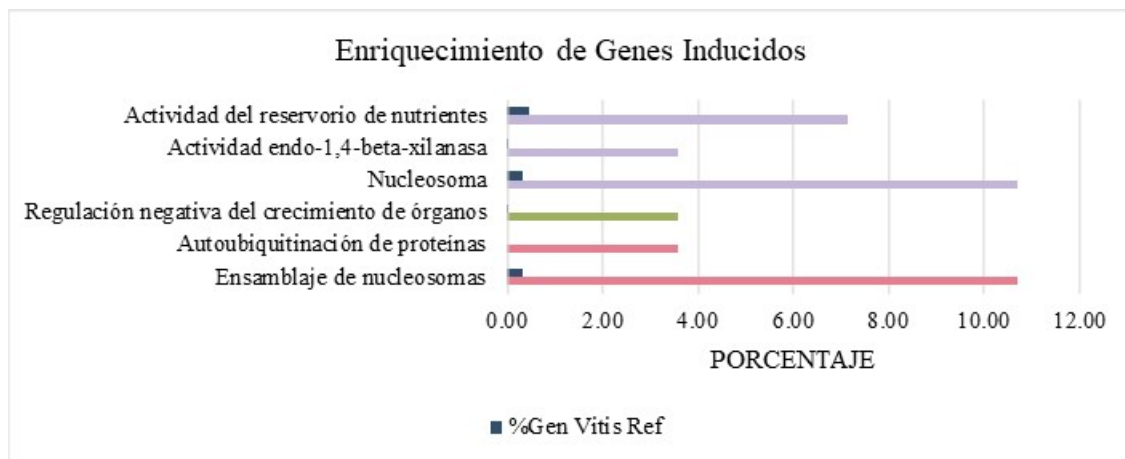


Figura 4. Gráfico de Vías GO (ontología genética) enriquecidas de los genes inducidos en respuesta al congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). Se muestra el porcentaje de diferencia entre referencia y transcriptoma probado. Categorizados en proceso biológico (lila), componente celular (verde) y función molecular (rosas).

Con los procesos inducidos enriquecidos obtenidos en el presente estudio se puede inferir que los embriones de vid están atravesando por un estrés a causa del congelamiento/descongelamiento en el cual probablemente esté sucediendo un re-modelamiento en nucleosoma como resultado de los procesos mayormente inducidos como se muestra en la **Figura 4**, provocando cambios en la

transcripción de genes posiblemente relacionados con procesos epigenéticos, en donde, se presenta una respuesta en la expresión génica sin que ocurran cambios en la estructura del ADN. Además, la célula presenta un aumento en la reserva de nutrientes, ya que, al estar bajo el estrés del tratamiento busca sobrevivir utilizando de forma módica la energía disponible poniendo en pausa el desarrollo de la planta.

Por otro lado, en los genes reprimidos se encontró que 6, 3 y 13 términos GO se enriquecieron significativamente ($p < 0,01$) en las categorías de proceso biológico, componente celular y función molecular, respectivamente. Obteniendo mayormente enriquecidos el proceso biológico de unión de iones de calcio (5.8%) y funciones moleculares en constituyentes de pared celular (7.25%), región extracelular (9.42%), organización de la pared celular (2.17%) y transporte de protones acoplado a síntesis de ATP (3.62%) (**Figura 5**). Mismos procesos que coinciden con lo encontrado por Song *et al.* en 2017, al trabajar con trigo y exponerlo a tratamiento de congelación se obtuvo enriquecimiento de genes reprimidos en procesos relacionados con la actividad de transporte transmembranal, constituyentes de la pared celular y región extracelular, dichas coincidencias podrían indicar alguna respuesta relacionada con la membrada y su desactivación.

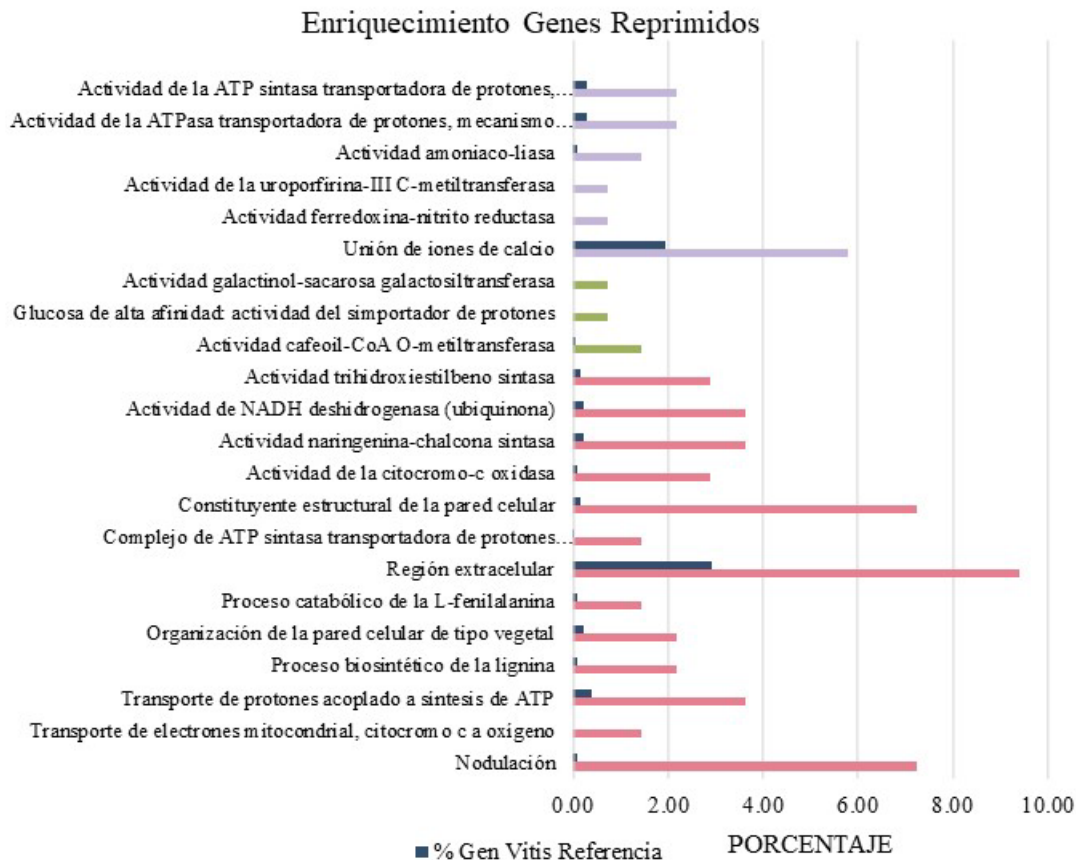


Figura 5. Gráfico de Vías GO (ontología genética) enriquecidas de los genes reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). Mostrando el porcentaje de diferencia entre referencia y transcriptoma probado. Categorizados en proceso biológico (lila), componente celular (verde) y función molecular (rosa).

Los datos obtenidos de los procesos enriquecidos en los genes reprimidos muestran que los embriones de vid están atravesando por un estrés a causa del congelamiento/descongelamiento en donde ocurre una contención en los procesos energéticos mediante la represión de los procesos realizados por enzimas como NADH y citocromo oxidasa, con la finalidad de sobrevivir el estrés causado por el tratamiento, además se observó una desactivación de componentes de la membrana celular reflejado en procesos relacionados con la enzima ATPasa, posiblemente a causa de los cambios en la fluidez de la misma provocados por las alteraciones en la temperatura, esto provoca reducción en la cantidad de energía disponible.

6.6. Distribución en Clasificación de Enzimas (EC) Presentes en el Transcriptoma a Causa de Congelamiento/Descongelamiento

La clasificación EC (Números de la Comisión de enzimas), es una clasificación numérica para enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. La distribución enzimática es un parámetro de las principales reacciones que se están induciendo (**Figura 6**) en respuesta al tratamiento PVS2NL. Los resultados del perfil de expresión génica coinciden con las vías enriquecidas mostrando la expresión inducida de algunos genes que codifican para enzimas hidrolasas principalmente glicosilasas (EC:3.2), encargadas del primer paso en la vía de reparación de escisión de bases (BER), las glicosilasas de ADN de las plantas inducen la desmetilación del ADN lo que se relaciona con la regulación positiva de genes (Parrilla-Doblas *et al.*, 2019), la vía BER se encarga de contrarrestar los efectos mutagénicos y citotóxicos de los daños en las bases nitrogenadas (Drohat y Coey, 2016). La desmetilación induce la activación de genes relacionados con el estrés abiótico, lo que coincide con estudios donde se muestra que al exponer tejidos vegetales a crioconservación aumentan los niveles de desmetilación (Choi y Sano, 2007; Nuc *et al.*, 2016). Otra de las clasificaciones enzimáticas repetidamente inducidas fueron las oxidoreductasas, principalmente las encargadas de la incorporación o reducción de oxígeno molecular (EC:1.14), dentro de ellas las oxigenasas, encargadas de oxidar los sustratos utilizando uno o dos átomos de oxígeno, presente en la síntesis y catabolismo de metabolitos en plantas (Carrillo-Campos, 2019). Un importante ejemplo de una enzima que presenta este esquema es el citocromo P450, el cual es conocido por tener un papel importante en la desintoxicación, biosíntesis de antioxidantes, defensa contra duras condiciones ambientales, entre otros (Pandian *et al.*, 2020). Se sabe que el estrés por frío afecta el transporte de electrones, lo que lleva al daño oxidativo causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido algunos autores han reportado la expresión inducida significativamente de genes citocromo P450 por causa del estrés por frío en especies de *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*, *Oryza sativa* y *Arabidopsis* (Bilodeau *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2017; Waseem *et al.*, 2021).

Distribución Código de Enzimas en Genes Inducidos

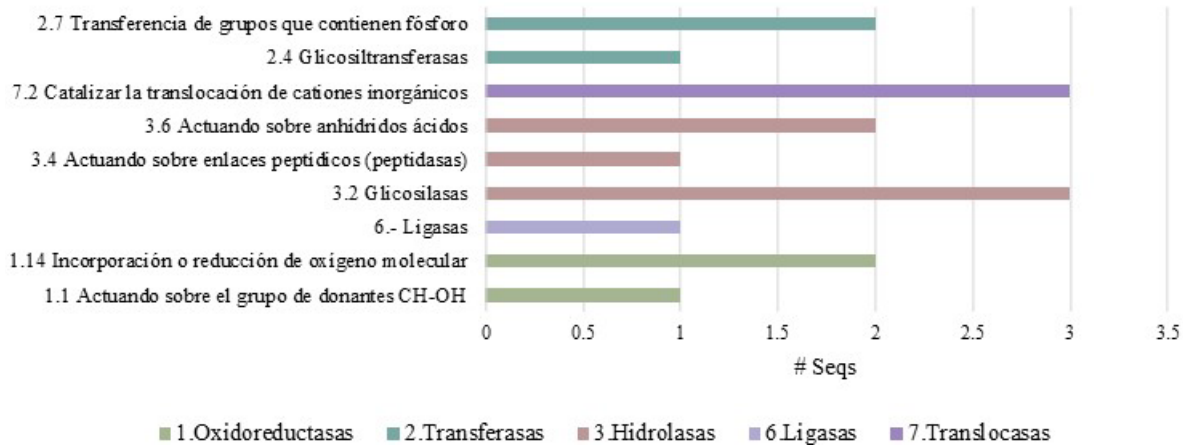


Figura 6. Gráfico de Distribución EC (Números de la Comisión de enzimas) en Genes Inducidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). Cada color representa a una Clasificación primaria de las enzimas.

Estos resultados muestran que las principales reacciones detectadas en la célula a causa del congelamiento/descongelamiento fueron hidrólisis de enlaces químicos, especialmente en enlaces glicosílicos, representado por las enzimas glicosilasas, las cuales son principalmente utilizados en la remoción de citosinas metiladas en el ADN, indicando nuevamente cambios en la expresión durante el estrés.

Por otro lado, la distribución enzimática de las principales reacciones que se están reprimiendo en respuesta al tratamiento PVS2NL se puede observar en la **Figura 7**, donde destaca la represión de enzimas transferasas, principalmente las glicosiltransferasas (EC:2.4) catalizan la transferencia de azúcares a una amplia gama de moléculas aceptoras, son fundamentales para la biosíntesis de las paredes celulares de las plantas, reensamblaje y degradación de polímeros de xiloglucano, la principal hemicelulosa de la pared celular primaria, reforzando o reparando daños de la pared durante el crecimiento y en respuesta a tensión abiótica (Reilly *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008). Coincidiendo con las vías reprimidas enriquecidas, donde se presenta una represión en los constituyentes de pared celular.

Otra de las clasificaciones enzimáticas reprimidas fueron las enzimas translocasas, encargadas de catalizar la translocación de hidrones (EC:7.1). Una translocasa importante contenida en este grupo es la ATPasa, identificada por su importante función de transporte a través de membrana y necesaria como fuente de energía (Zhang *et al.*, 2006). Al igual que en el presente estudio,

resultados similares publicados comprueban la inhibición de actividad en ATPasa ante el estrés por frío en *Arabidopsis* y *Vitis vinifera* (Dietz *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006; Muzi *et al.*, 2016). La estabilidad estructural y funcional tanto de la membrana como de la pared celular es crucial en la adaptación de la planta al estrés por temperatura, los resultados obtenidos muestran una probable desactivación o tal vez pérdida de funcionalidad de las mismas.

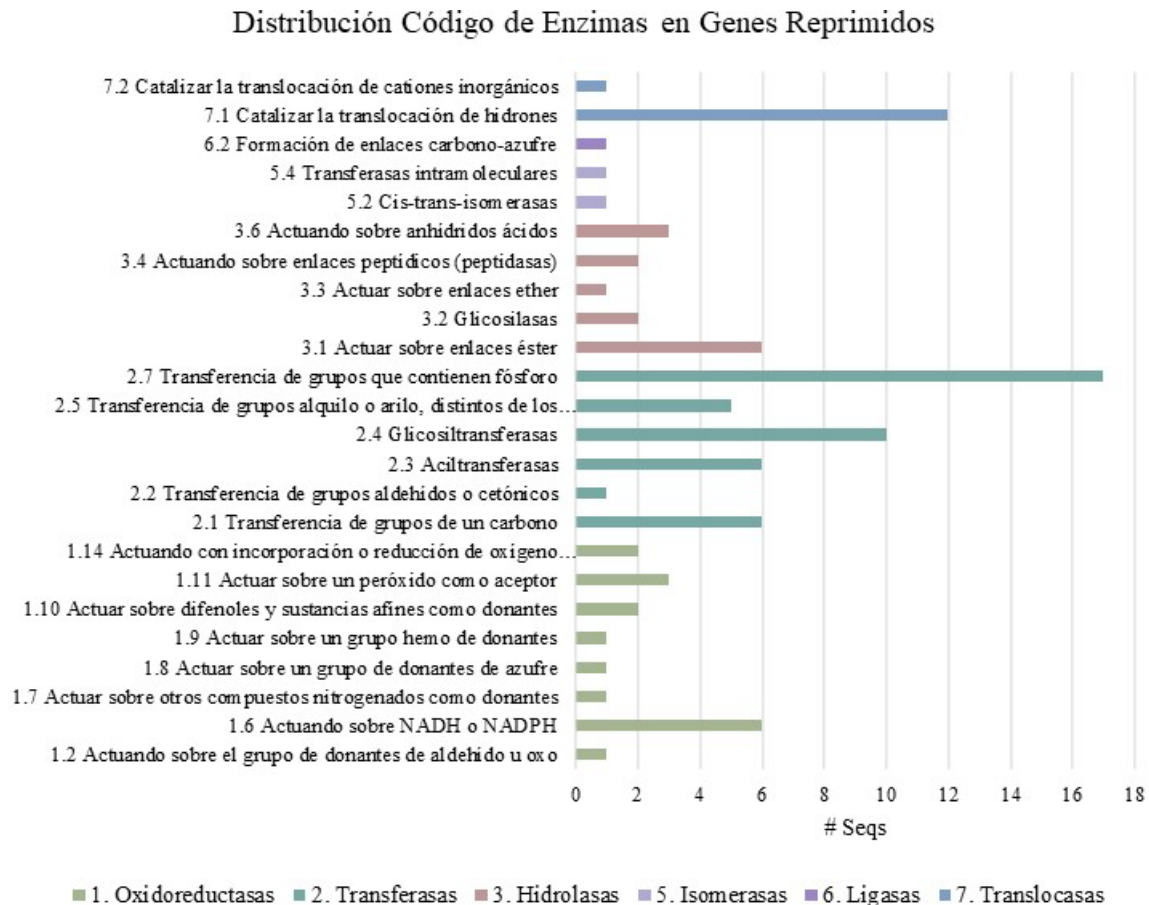


Figura 7. Gráfico de Distribución EC (Números de la Comisión de enzimas) en Genes Reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). Cada color representa a una clasificación primaria de las enzimas.

Las reacciones que mayormente están siendo reprimidas en el proceso de defensa celular contra el congelamiento/descongelamiento son de transferasas, en donde destaca la transferencia de grupos con fósforo conocidas como cinasas, relevantes en la generación de energía, transporte de señal al

núcleo, así mismo, se encuentra represión en reacciones pertenecientes a componentes de pared y membrana celular indicando nuevamente una pausa en la actividad energética de la célula.

6.7. Identificación de Genes Expresados Diferencialmente

En el **cuadro 4** se muestran cuarenta de los genes mayormente expresados inducidos (20) y reprimidos (20) a causa del tratamiento de congelamiento/descongelamiento durante la criopreservación con altos valores de cambio en FoldChange con respecto al control.

Cuadro 4. Lista de Genes Identificados Expresados Diferencialmente a causa del congelamiento/descongelamiento. Mostrando su ID de Ensembl plant, nombre, log2FC (veces el cambio en la expresión) los valores positivos indican inducción mientras que los negativos represión y categoría en GO: Vías en las que se encuentran involucrados.

ID	Nombre	Log2FC	Categorías GO: Componente celular, Expresión biológica, Estructura bioquímica
VT_004164640320	Proteína proteasa sin nombre, parval	4.4087592	Componente integral de la membrana
VT_004164640820	Proteína quinasa 2-like	5.5872791	Paraproteína transmembrana; Función de la proteína transportadora transmembrana; Componente integral de la membrana
VT_004060461520	1734Da clase II similar a una proteína de choque térmico	2.5469894	Proteína de choque térmico; Proteína de choque térmico; Proteína de choque térmico; Proteína de choque térmico
VT_004060461560	Resistencia a la congelación Proteína similar a RFP19.4	2.11705878	sin término po
VT_004060461600	Choco como 1940 76.12	1.9416025	Función de transporte; Función de unión de lípidos; Función de unión de lípidos; Función de unión de lípidos; Función de unión de lípidos; Función de unión de lípidos
VT_004060461640	Hemina H4	1.77556413	Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas
VT_004060461680	Enzima oxidante 5, isoforma proteica 1	1.67815821	sin término po
VT_004060461720	Molécula de oxígeno probable 1	1.60067548	P. proceso metabólico de carbohidratos; Actividad de la E. fijación de nitrógeno; L3 beta D. ribonucleasa
VT_004060461760	Proteína CUP-SHAHD CUYTEDON 9-like	1.57914411	Regulación de la transcripción, con pleiotipia de ADN; Función de ADN
VT_004060461800	Factor de transcripción sensible al calcio similar a DRF109	1.5995458	Regulación de la transcripción, con pleiotipia de ADN; Función de ADN; Función del factor de transcripción de unión de ADN; Unión de calcio
VT_004060461840	Calcio y calmodulina dependiente de serinotreonina proteína	1.5119845	Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas; Proteína de unión de nucleosomas
VT_004060461880	Proteína similar a la gamma 9.3	1.4859917	Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060461920	Anti-epinefrina 1-like R4p36	1.48309561	P. proceso metabólico de azúcar; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060461960	Proteína de unión de nucleosomas similar a RGA3	1.36785828	sin término po
VT_004060462000	Proteína de unión de nucleosomas similar a RGA3	1.2869079	Propuesta de definición; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462040	ES oligomérica ligasa Big-Big color	1.19674779	Regulación negativa de la proliferación de la población celular; P. regulación negativa del crecimiento de los órganos; Proliferación celular; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462080	Hemina H3.2	1.19548482	Función de ADN; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462120	Enzima oxidante 5-like 3 isoforma XS	1.19067928	Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462160	Proteína similar a HVA2.2	1.11901883	Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462200	Suprotéico transportador ABC C miembro de la familia 15	1.1119107	Paraproteína transmembrana; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462240	Alcohol dehidrogenasa similar a la 2 isoforma XI	1.10970113	Proceso metabólico de formaldehído; E. actividad de la alcohol dehidrogenasa; Dependencia de zinc; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462280	Dado de zinc tipo caga B	-2.0802627	P. hidratación de enlaces fosforados de azúcar nucleico; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462320	Proteína F beta-FRW2	-2.1617848	Regulación positiva de la actividad catalítica; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462360	Proteína ribonucleasa S10	-2.2066529	Carboxonema
VT_004060462400	Proteína G3A(X) LIKE 4	-2.1929495	Función de hidratación
VT_004060462440	ED11 carboxonema 2-like	-2.1604664	Proceso metabólico de ADN, carboxonema; E3-S; actividad catalítica carboxonema; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462480	Transportador de zinc 8-like	-2.1798484	Paraproteína transmembrana de unión de zinc; Función de la proteína transportadora de unión de zinc; C. membrana plasmática; Componente integral de la membrana
VT_004060462520	Serina/threonina proteína quinasa SD1 8 similar a un receptor	-2.409197	Proteína de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas; Función de unión de nucleosomas
VT_004060462560	Glicólisis 8 isoforma U7	-2.4128656	P. proceso metabólico de glucólisis; Función de la transición de glucólisis; Catabolismo
VT_004060462600	Resposta proteica al bajo cambio de azúcar 2	-2.6091097	P. desaminación catalítica celular
VT_004060462640	ATPasa intrínseca 1	-2.6092739	ATPase intrínseca; ATPase intrínseca; ATPase intrínseca; ATPase intrínseca; ATPase intrínseca
VT_004060462680	Caféico azul 1.0 isoforma transmembrana 1	-2.6520771	Proceso bioquímico de lípidos; P. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación
VT_004060462720	Ácido cafeico 9.0 isoforma transmembrana 1	-2.6709483	Proceso bioquímico de lípidos; P. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación; Función de la membrana dependiente de S. oxidación
VT_004060462760	Valsartona similar	-2.8520116	E. unión de zinc de magnesio; Actividad de la E. expresión similar
VT_004060462800	Proteína similar a la calixulina 65	-3.3672936	Función de unión de nucleosomas
VT_004060462840	Nucleína 75 isoforma	-5.5748659	sin término po
VT_004060462880	GDSL esterasa ligasa ARG	-3.6251854	Función de hidratación, que actúa sobre nucleosomas; Catabolismo
VT_004060462920	Expansina A1	-3.6994542	P. organización de la pared celular de tipo vegetal; Catabolismo celular; Catabolismo celular; Catabolismo celular
VT_004060462960	Proteína de hidratación de glucólisis	-4.4119795	P. proceso metabólico de glucólisis; Función de la transición de glucólisis; Catabolismo
VT_004060463000	Caféico CoA 0 isoforma transmembrana	-4.7266617	Proceso bioquímico de lípidos; P. oxidación; Actividad de la proteína CoA 0 isoforma transmembrana
VT_004060463040	Proteína quinasa similar a un receptor HBL1	-5.911429	Proteína quinasa similar a un receptor; Función de la proteína quinasa similar a un receptor; Función de la proteína quinasa similar a un receptor; Función de la proteína quinasa similar a un receptor

Los genes con valores de cambio en su expresión más significativo se muestran en la **Figura 8**, destacando entre los inducidos genes que codifican para proteínas hipotéticas como el producto proteico sin nombre (PSN), Proteína spinster 2-like, proteína de choque térmico 17,3 kDa clase II, Proteína similar a RPP13 4 de resistencia a la enfermedad, Citocromo P450 76A2, Histona H4, Probable Nucleoredoxina 1, Proteína CUP-SHAPED COTYLEDON 3-like. Mientras que, en los reprimidos están presentes el Proteína quinasa similar a un receptor HSL1, Transportador de zinc 8-like, Serina/treonina-proteína quinasa SD1-8, Glutación S-transferasa U7, Proteína en respuesta al bajo contenido de azufre 2, ATPasa subunidad 1, Ácido cafeico 3-O-metiltransferasa 1, Valenceno sintasa, Proteína similar a la calmodulina 65, Nodulina-75 temprana y Expansina-A1.

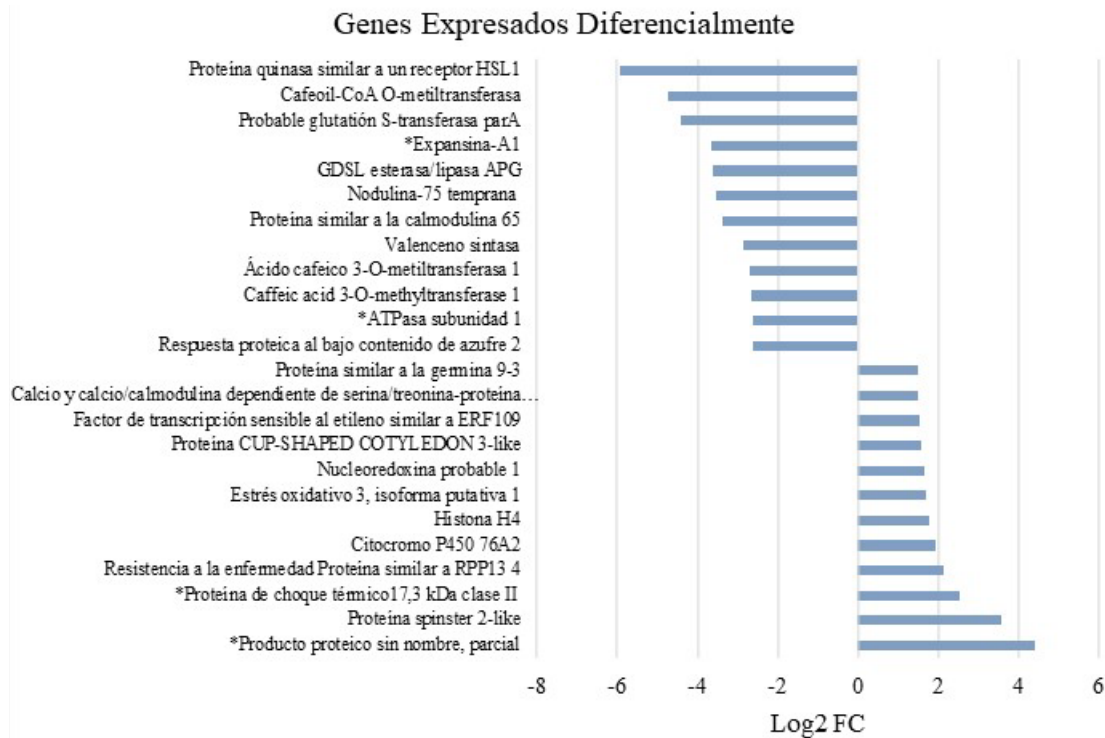


Figura 8. Genes más inducidos y más reprimidos a causa del congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). Muestra log₂FC (veces el cambio en la expresión) y listado de genes identificados. Solo se presentan los genes con Log₂ FC con los valores más altos.

Los genes con mayor cambio en su expresión nuevamente mostraron una inducción en los procesos de defensa ante estrés, como proteínas de resistencia a enfermedad, de choque térmico, de estrés oxidativo e histonas, indicando que se quiere contrarrestar posiblemente una acumulación de

especies reactivas de oxígeno, un desplegamiento de proteínas importantes para la célula, además de la modificación de la expresión genética. La represión de la célula ocurre en proteínas importantes de membrana y pared celular principalmente, lo que coincide con una posible desactivación de estas a causa del tratamiento posiblemente por pérdida de funcionalidad.

Los genes seleccionados para la validación del transcriptoma se encuentran marcados con un asterisco en la **Figura 8**. Dentro de los genes mayormente inducidos se encuentra la proteína de choque térmico 17.3 kDa clase II (ID: VIT_04s0008g01550), clasificada dentro del grupo de chaperonas moleculares, las proteínas de choque térmico se conocen por ser comúnmente expresadas durante estrés ambiental (Sturm *et al.*, 1999). Esto debido a que la desnaturalización o plegamiento incorrecto de las proteína es consecuencia directa o indirecta de cualquier estrés que impida las funciones celulares normales realizadas por las proteínas. Es decir, cualquier factor de estrés requerirá la presencia de proteínas de choque térmico o chaperonas (Jacob *et al.*, 2017). En este sentido, se conoce que la proteína de choque térmico 17.3 kDa mediante la interacción con osmolitos, reguladores y moléculas de señalización, se encarga de restaurar la función de proteínas dañadas (Wang *et al.*, 2004). En relación a lo anterior, se ha identificado un aumento en la expresión de la proteína de choque térmico 17.3 KDa ante la exposición de calor de *Lactuca sativa*, indicando que participa en el reconocimiento del estrés y replegamiento de proteínas durante la condición de estrés (Kang *et al.*, 2021). Del mismo modo, HSP 17.3 kDa se indujo en *Arachis hypogaea* bajo estrés hídrico, identificándola de igual forma como participante en el replegamiento de proteínas afectadas en la búsqueda de restablecer la homeostasis celular (Thangella *et al.*, 2018). Por otro lado, al igual que en el presente análisis se ha identificado la presencia de HSP 17.3 kDa ante el estrés por frío en *Arabidopsis thaliana*, identificando a la proteína con un papel clave en la tolerancia al frío y calor (Wang *et al.*, 2017). Al analizar los resultados, podemos sugerir que posiblemente debido al aumento en la expresión de HSP 17.3 kDa, la proteína es participe de una red de respuesta al congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación en búsqueda de reestablecer el equilibrio celular alterado por el estrés.

Otro de los genes mayormente inducidos es producto proteico sin nombre (ID: VIT_01s0146g00320), sin embargo, gracias a la identificación de su clasificación GO se encontró que es un componente integral de la membrana, es decir, genera un producto génico que cuenta con al menos una parte de su secuencia peptídica incrustada en la región hidrófoba de la membrana. El gen fue alineado por secuencias homologas con el gen de *Arabidopsis Thaliana* SLAC1

AT1G12480.1, el cual se identifica en la planta como una proteína mediadora de la sensibilidad al CO₂ en la regulación del intercambio de gases y la disipación de aniones sobre acumulados, participando en mantenimiento de la homeostasis de aniones orgánicos/inorgánicos a nivel celular (Negi *et al.*, 2008). Así mismo, se identifica como componente clave en la regulación de la presión osmótica celular, siendo la familia de proteínas SLAC1 perteneciente a un canal aniónico las que median con su activación en la membrana el cierre de estomas ante estrés por sequía (Sierla *et al.*, 2018). Su regulación al alza se ha presentado como una respuesta al cambio en la concentración de CO₂, ácido abscísico, ozono, transiciones de luz/oscuridad, cambios de humedad, iones de calcio, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, moviendo la proteína componente de membrana esencial para el cierre de los estomas en respuesta a estrés (Vahisalu *et al.*, 2008). Considerando los datos reportados y su homología con el gen de producto proteico sin nombre (ID: VIT_01s0146g00320) obtenido en este estudio, podemos sugerir que esta al inducirse a causa del congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación está cumpliendo con la función de búsqueda de restablecer la homeostasis celular contrarrestando el estrés osmótico provocado por el tratamiento de congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación.

Por otro lado, uno de los genes con mayor represión en el transcriptoma generado es la Expansina-A1 (ID: VIT_01s0026g02620). La familia de expansina se encarga de desbloquear la red polisacárido de la pared celular, al unirse a la celulosa recubierta de glucano en la pared celular, provoca una ruptura reversible de los enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y la matriz de glucano relajando la pared (Sampedro *et al.*, 2015). Estudios relacionan la inducción en la expresión de expansina a la relajación del estrés involucrada en procesos de desarrollo y resistencia a estrés mediante la elongación de la pared (Cosgrove, 2000). Se ha reportado la expresión diferencial de la proteína Expansina A1 bajo una variedad de tensiones abióticas como salinidad, metales pesados y sequía en *Solanum tuberosum* (Chen *et al.*, 2019). Del mismo modo su aumento en la expresión se le relacionó con una mayor regulación osmótica y respuesta antioxidante en *Arabidopsis* aumentando así la tolerancia y supervivencia de las plantas en condiciones de estrés por baja temperatura, sin embargo en el mismo análisis de *Arabidopsis* se encontró que al aumentar el tiempo de exposición al frío aumentaban los genes reprimidos de expansinas lo que podría indicar una estabilidad de la pared celular (Feng *et al.*, 2019). En este aspecto, los resultados obtenidos en el presente transcriptoma identifican el gen de Expansina-A1 reprimido a causa del congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación, cual podría

indicar que en el tratamiento control (PVS2) se contaba con una mayor cantidad de producción del gen a causa de algún estrés hídrico provocado por el tratamiento con crioprotectores, el cual, se logró estabilizar posterior al tratamiento (PVS2NL), en donde no fue requerida una expansión en la pared celular y por consecuencia la expresión del gen expansina.

El gen ATPasa subunidad 1 (ID: VIT_00s0733g00010) es otro de los mayormente reprimidos en el presente análisis de transcriptoma. Las ATPasas en las células vegetales se distribuyen ampliamente en varias membranas del citoplasma, cloroplasto, mitocondria y vacuola, se identifican por su importante función de transporte a través de membrana (Zhang *et al.*, 2006). La enzima participa de manera activa en la respuesta a estrés salino desempeñando un papel de transporte de iones, se ha detectado que las ATPasas tienen un papel en la regulación sobre sequía, frío y metales pesados (Wang *et al.*, 2020). Se ha reportado disminución en la expresión y actividad de las ATPasas cuando las plantas se someten a bajas temperaturas (Dietz *et al.*, 2001). Al igual que en el presente estudio, resultados similares publicados comprueban la inhibición de actividad en ATPasa ante el estrés por frío en *Arabidopsis* y *Vitis vinifera* (Zhang *et al.*, 2006; Muzi *et al.*, 2016). La desactivación de la ATPasa podría traer como consecuencia de inhibición la formación de gradientes de pH, probablemente se altera la compartimentación de solutos y baja energía en la célula.

Los resultados generados en el transcriptoma indican un cambio en la fluidez de la membrana celular, posiblemente causado por el ajuste que debe hacer la célula al exponerse a cambios de temperatura por el congelamiento/descongelamiento durante el protocolo de crioconservación, así mismo, se identificó aumento en las proteínas de defensa al cambio de temperatura, posiblemente causado por el estrés celular. Estos genes antes mencionados fueron seleccionados para la validación del transcriptoma y se encuentran marcados con un asterisco en la **Figura 8**.

6.8. Diseño de Oligonucleótidos Específicos de Genes Seleccionados para Validación del Transcriptoma

Una vez obtenido y seleccionado las secuencias de cada gen del transcriptoma de los embriones cigóticos de vid crioconservados, se diseñaron los cebadores específicos. De los resultados

arrojados por el programa “QuantPrime” se seleccionaron los mejores 2 pares de cebadores para cada gen, proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP17.3), Proteína sin nombre (PSN), Expansina-A1 (EXP-A1) y ATPase subunidad 1 (ATPasa sub1), que se muestran en el **Cuadro 5** junto con sus características específicas. La selección se llevó a cabo tomando en cuenta el análisis realizado por UGENE respecto al contenido Citosina-Guanina, que debe estar entre el 45-50%, la longitud de sus cadenas entre 50-180 pares de bases y que su temperatura de fusión se encuentre alrededor de 65°C con variación de 3 °C.

Se obtuvo los cebadores específicos de cada gen seleccionado para la validación del transcriptoma involucrados en respuesta a congelamiento/descongelamiento los cuales servirán para los análisis de expresión génica. Además, se consideró como gen constitutivo o de referencia el gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *V. vinifera* reportado por García-Coronado *et al.*, en 2015. Para la cuantificación de la expresión mediante termocicladora de tiempo real cuantitativa se usaron los oligonucleótidos diseñados (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Oligonucleótidos de genes seleccionados para validación de transcriptoma en respuesta a congelamiento/descongelamiento. TM: melting temperature (temperatura de fusión en °C), AP: Amplicón (tamaño).

INDUCIDOS	ID Ensembl plant	LogF C	FW Sequence	RV sequence	TM	AP
HSP17.3	VIT_04s0008g01550	2.54	CGTGGTGAACGGAAGAAAG GTG	ACCAAATAAGAATAGCCGG TGCTC	69.7	144
			CGTGGTGAACGGAAGAAAG GTG	TACGTGATATCCCACGCCAG TC	66.8	
PSN	VIT_01s0146g00320	4.40	TCATGTGCTGCTCTCTGAAG GC	GGCAACCAAGGTTGTCTCAA GC	69.1	86
			ATCATGTGCTGCTCTCTGAA GGC	GGCAACCAAGGTTGTCTCAA GC	68.9	
REPRIMIDOS	ID Ensembl plant	LogF C	FW Sequence	RV sequence	TM	AP
EXP-A1	VIT_01s0026g02620	-3.63	TCAATGCAAAGCGTCTTGA CCTC	AGCCACCTCTTGAAACCACC TC	69.4	60
			CTCAATGCAAAGCGTCTTG ACCTC	AGCCACCTCTTGAAACCACC TC	67.6	
ATPasa sub 1	VIT_00s0733g00010	-2.60	TGGCTAGTTGTGGTCATTCC CTAC	GCAAGCAACCATCTTCCCAA ATCC	66.9	71
			GTGCACTTCTGATTTAGCC TTGG	AGTCCGCTCTTCTGTATGGT CAAC	71.9	
GEN DE REFERENCIA	GenBank Accesion		FW Sequence	RV sequence	TM	AP
GAPDH de <i>V. vinifera</i>	CB973647		TTCTCGTTGAGGGCTATTCC A	CCACAGACTTCATCGGTGAC A	66.3	70

6.9. Ensayo de Disociación de los Oligonucleótidos Diseñados para los Genes Proteína de Choque Térmico 17.3 Kda, Proteína sin Nombre, Expansina-A1 y ATPasa Subunidad 1

Mediante un ensayo de disociación se logró corroborar la especificidad de los oligonucleótidos como se muestra en la **Figura 9**, donde “A” es la curva del gen HSP con una $T_m=79.14$, “B” representa a la Proteína sin nombre con $T_m=81.07$, “C” la curva del gen EXP-A1 con $T_m=79.73$ y “D” la del gen ATPasa sub1 con $T_m=78.50$. Al encontrar un solo pico en cada uno de los ensayos se demostró la amplificación específica de los oligonucleótidos diseñados, sin la formación de dímeros.

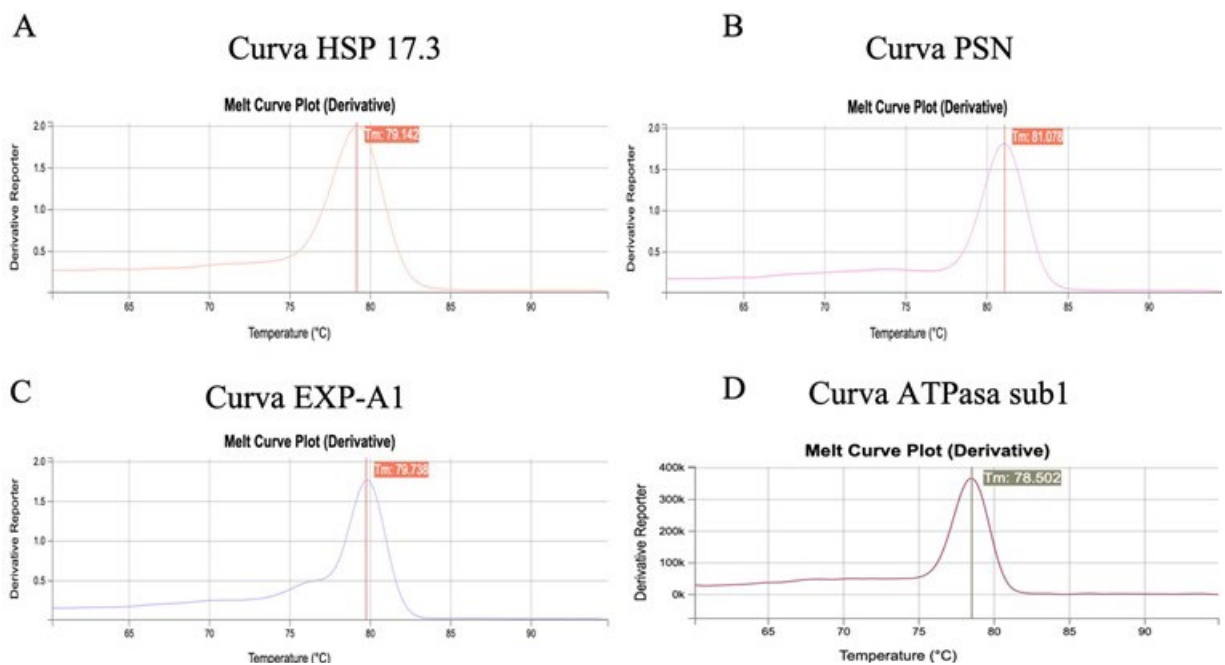


Figura 9. Curvas de Disociación. Generadas utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para los genes Proteína de choque térmico 17.3 Kda (A), Proteína sin Nombre (B), Expansina-A1 (C) y ATPasa subunidad 1(D).

6.10. Rangos Dinámicos de los Genes Proteína de Choque C térmico 17.3 Kda, Proteína sin Nombre, Expansina-A1 y ATPasa Subunidad 1 Contra el Gen Constitutivo GAPDH y Análisis de Eficiencia de Amplificación Utilizando RT-PCR

El presente ensayo permitió conocer el comportamiento de los oligonucleótidos en el sistema que se va a utilizar para evaluarlos. El rango dinámico se refiere al intervalo de concentraciones en el que se garantiza que se obtiene valores de Ct proporcionales a la concentración de ARN mensajero. Por otro lado, la eficiencia indica el nivel en que la amplificación ocurre de forma exponencial durante la reacción de PCR y proporciona información sobre cantidades de ADNc a utilizar en la cuantificación, indicando la cantidad de producto que se forma durante los ciclos (Cuevas Reyes *et al.*, 2016). Como resultado del ensayo de rangos dinámicos se obtuvo las gráficas de calibración mostradas en la **Figura 10**. Se encontraron eficiencias de amplificación similares entre el gen constitutivo GAPDH y los genes diana (HSP 17.3 KDa, Proteína sin Nombre, EXP-A1 y ATPasa), todas cercanas a 100%. Con base en los resultados se decidió continuar con la evaluación de la expresión por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Cabe mencionar que en todo momento del ensayo se aseguró que los amplicones formados en los puntos de la dilución y sus réplicas obtuvieran la misma T_m obtenida en el ensayo de disociación.

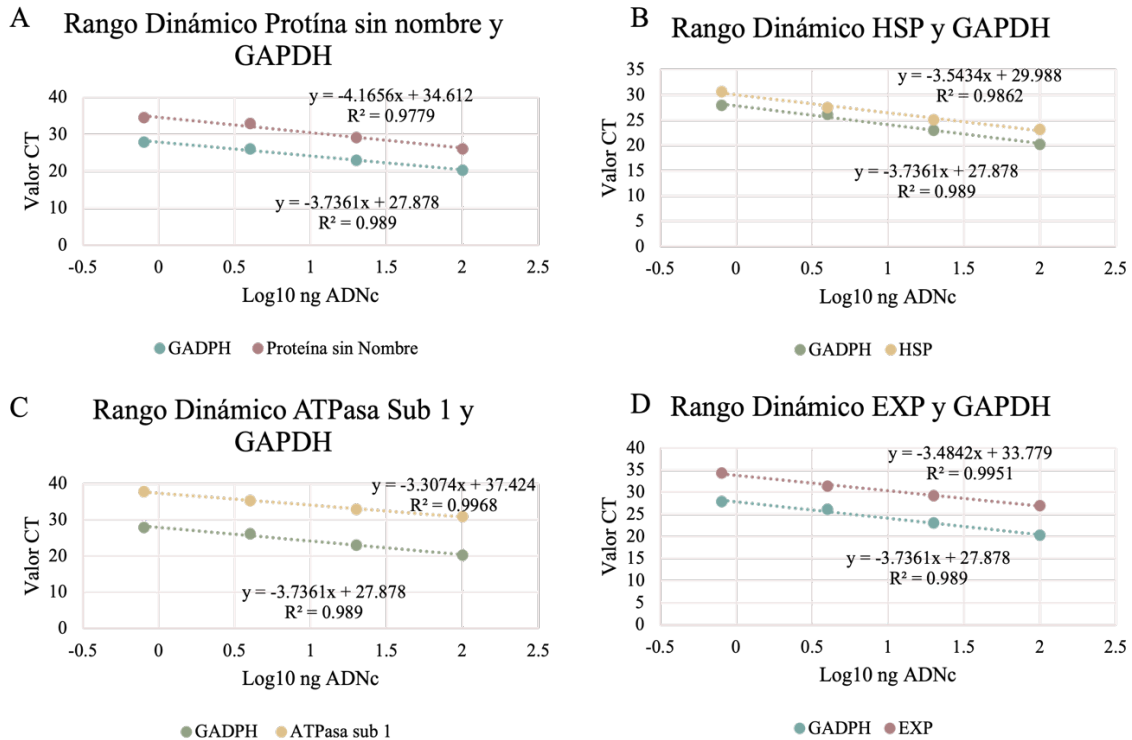


Figura 10. Gráfico de Rangos Dinámicos Genes Diana contra Gen Referencia GAPDH. Proteína sin Nombre (A), Proteína de choque térmico 17.3 Kda (B), ATPasa subunidad 1(C) y Expansina-A1 (D).

6.11. Expresión Relativa de los Genes Proteína de Choque Térmico 17.3 Kda, Proteína Sin Nombre, Expansina-A1 Y Atpasa Subunidad 1 Mediante Qrt-PCR

La cuantificación relativa es comparar cuantitativamente el ácido nucleico diana (genes seleccionados para la validación del transcriptoma) con respecto a un gen de referencia constitutivo. Se analizaron los genes seleccionados mediante qRT-PCR utilizando dos réplicas biológicas con triplicado técnico en donde se obtuvieron valores los medios de Ct en datos crudos que se observan en la **Figura 11**.

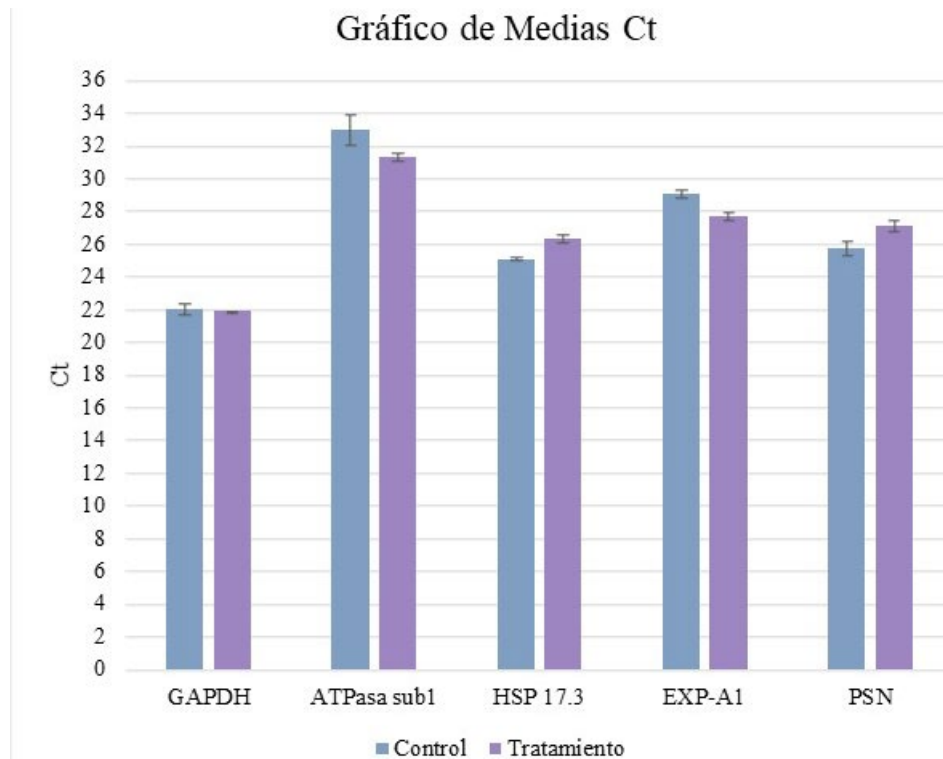


Figura 11. Gráfico Valores de Ciclo de umbral (Ct) comparativo. Muestras control (PVS2) y Tratamiento (PVS2NL). Las barras corresponden a la media \pm error estándar.

Utilizando los datos crudos presentados anteriormente, se determinó la expresión relativa de los genes seleccionados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), Los resultados del análisis muestran que el congelamiento/descongelamiento durante la vitrificación causó una disminución ($p < 0.05$) en la expresión de los genes ATPasa subunidad 1 (ATPasa sub1) y Expansina-A1 (EXP-A1). Por otro lado, el tratamiento arrojó como resultado la inducción de los genes Proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP 17.3), Proteína sin Nombre (PSN) como se muestra en la **Figura 12**. Los resultados encontrados muestran un comportamiento similar en genes inducidos y reprimidos obtenidos *in silico* (**Figura 13**), lo que permite la validación del transcriptoma generado en el presente estudio.

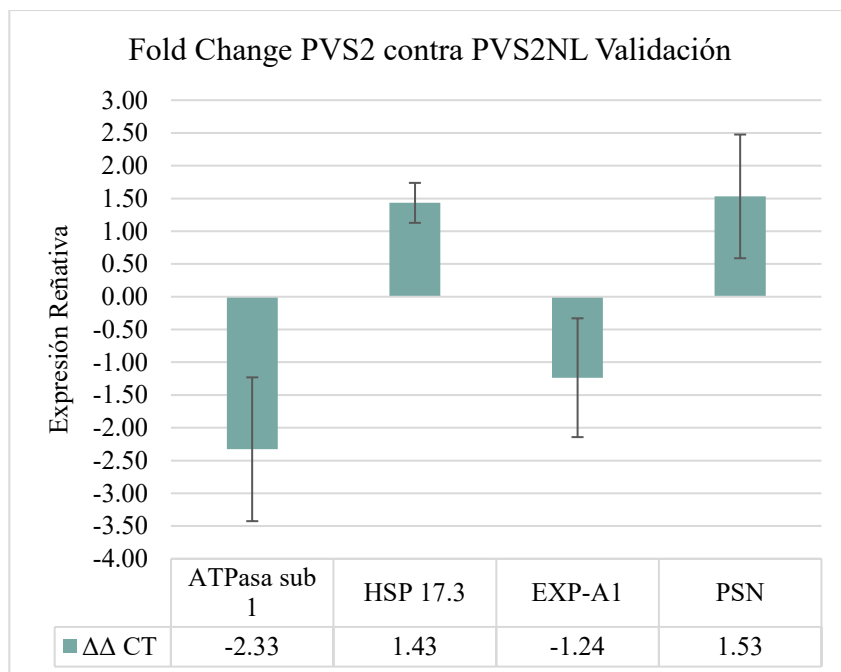


Figura 12. Expresión Relativa de Genes Proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP 17.3), Proteína sin Nombre (PSN), Expansina-A1 (EXP-A1) y ATPasa subunidad 1 (ATPasa sub1). Los datos se muestran como la media \pm DE. 2 Réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas.

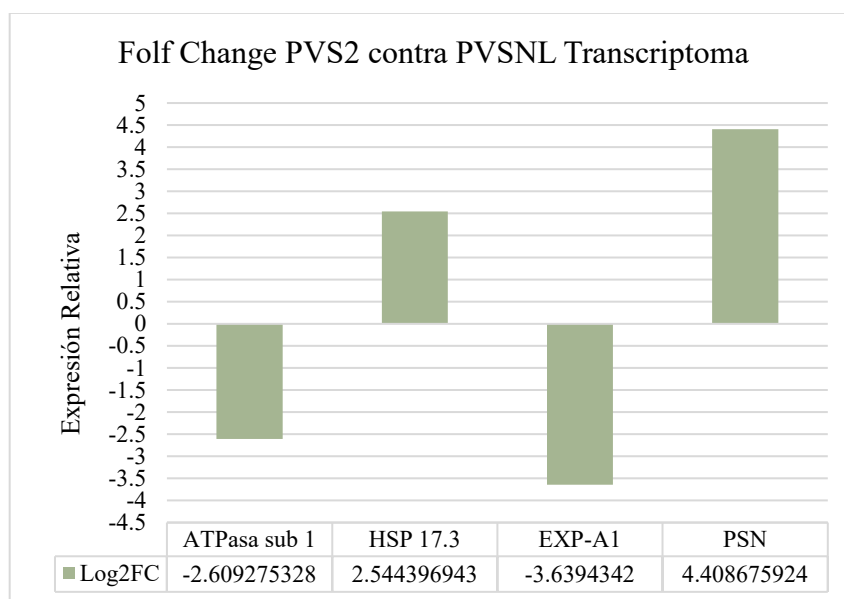


Figura 13. Expresión Relativa de Genes Seleccionados en el Transcriptoma. Proteína de choque térmico 17.3 KDa (HSP 17.3), Proteína sin Nombre (PSN), Expansina-A1 (EXP-A1) y ATPasa subunidad 1 (ATPasa sub1).

De forma comparativa se puede observar el mismo comportamiento presente en el transcriptoma (**Figura 12**) como el obtenido en la expresión relativa perteneciente a la validación por medio de qRT-PCR (**Figura 13**) en donde se obtuvo una represión de los genes ATPasa subunidad 1 y Expansina-A1, además de un aumento en la expresión de los genes Proteína de choque térmico y producto proteico sin nombre. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los valores obtenidos *in silico* y los arrojados por el termociclador cuantitativo. Se obtuvo un valor relación estadística entre las dos variables de 0.927843, lo que indica una correlación positiva muy alta cercana a uno. Por lo tanto, lo encontrado *in silico* es correcto y se logró comprobar mediante la validación utilizando qPCR tiempo real.

De acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio, se propone un mecanismo molecular hipotético de operación de los genes con mayor cambio en su expresión (**Figura 14**), en donde muy probablemente ocurre una activación en los mecanismos de defensa al estrés del congelamiento, dirigida por la proteína de choque térmico, inducción de cambios en el ensamblaje del nucleosoma y el aumento en la reserva de nutrientes de la célula de acuerdo a la inducción de genes como histonas y el factor de transcripción sensible a etileno. Por otro lado, una desactivación de componentes de pared celular importantes por la represión de genes como Proteína cinasa similar a un receptor HSL1, Nodulina-75 temprana y Expansina-A1, además de la disminución en el transporte de protones a través de la membrana provocado por la desactivación de ATPasa, esto en respuesta al proceso de crioconservación (congelamiento y descongelamiento) en embriones cigóticos de vid.

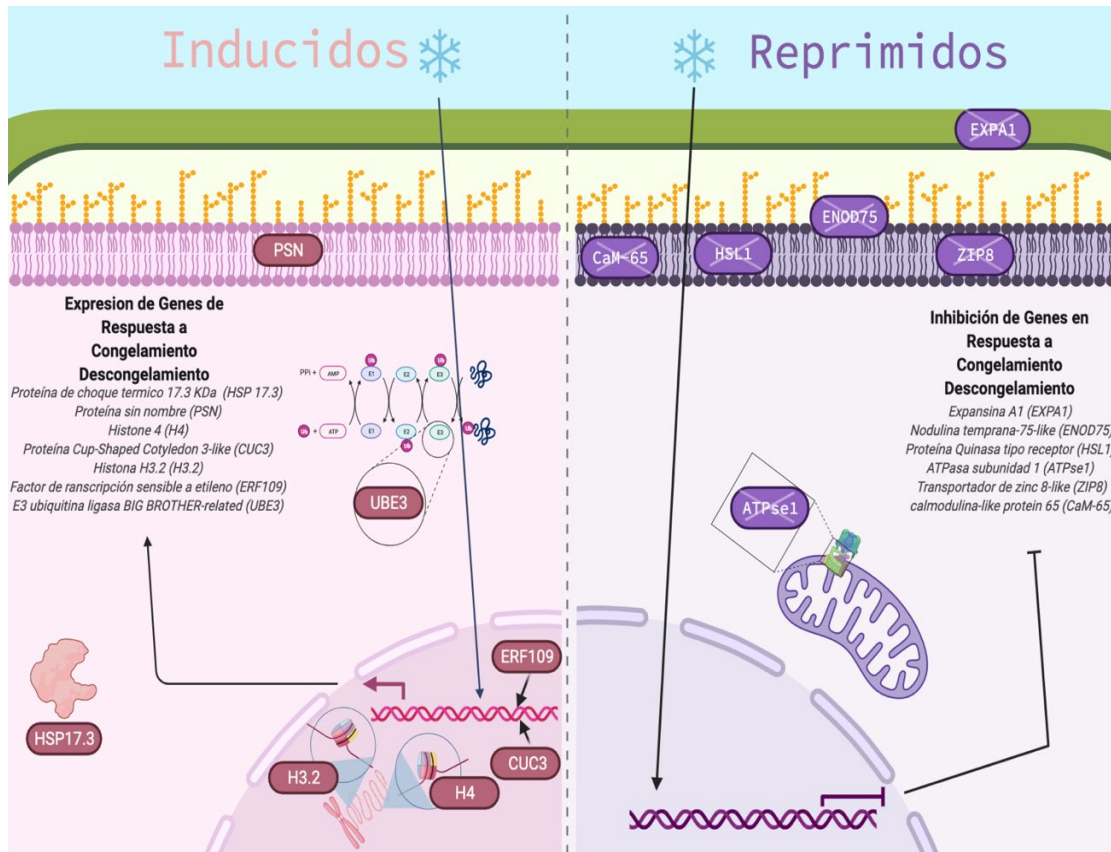


Figura 14. Modelo hipotético propuesto para la respuesta molecular causada por el congelamiento/descongelamiento en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.). El gráfico contiene los genes identificados en el transcriptoma como expresados diferencialmente.

7. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos del análisis del transcriptoma (validado mediante qPCR) en respuesta al proceso de congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera* L.) mostraron respuestas moleculares de protección en la célula debido a la presencia de alteraciones en la membrana y en la pared celular, cambios en la expresión genética, cambios en la estructura terciaria de proteínas y activación de señales al núcleo.

En el cual probablemente esté sucediendo un re-modelamiento en el nucleosoma, provocando cambios en la transcripción de genes posiblemente relacionados con procesos de regulación y potencialmente epigenéticos debido a la actividad de glicosilasas encontrada. Además, se presentó un aumento en la reserva de nutrientes, ya que, al estar bajo el estrés del tratamiento busca sobrevivir utilizando de forma módica la energía disponible poniendo en pausa el desarrollo de la planta. También ocurre una contención en los procesos energéticos, con la finalidad de sobrevivir el estrés, en donde se observó una represión de componentes de la membrana celular, posiblemente a causa de los cambios en la fluidez de esta provocados por las alteraciones en la temperatura o su probable desactivación.

8. PERSPECTIVAS

El conocimiento de las vías en respuesta al congelamiento/descongelamiento durante la crioconservación podría contribuir a optimizar el diseño de protocolos de crioconservación para cultivos de importancia económica como la uva (*Vitis vinifera* L.). El transcriptoma generado en los embriones apoyará en futuros experimentos que se realicen con embriones de uva y enriquecerá el conocimiento del genoma de uva.

Es importante que continúe la búsqueda de la generación del transcriptoma en las diferentes etapas del protocolo de crioconservación, con la finalidad de lograr identificar una red de respuesta específica, así como la dinámica de la misma para evitar el mayor daño celular posible. Las evidencias que se generen ayudarán al mejoramiento técnico de los protocolos de crioconservación en especies vegetales evitando sufrir cambios o lograr estabilidad genética por periodos de tiempo ilimitados.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A. 2001. Conservación in vitro de los recursos fitogenéticos. Editorial Tecnológica 4: 27.
- Ávila-Portillo, L.M., Madero, J.I., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G. et al. 2006. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 57: 291-300.
- Bacchetta, G., Bueno Sanchez, A., Fenu, G., Jiménez Alfaro, B., Mattana, E., Piotta, B., y Virevaire, M. 2008. Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias. 1-378.
- Baldoni, E., Genga, A., y Cominelli, E. 2015. Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences 16: 15811-15851.
- BANCOADN. 2020. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos.
- Bayati, S., Shams-bakhsh, M., y Moini, A. 2011. Elimination of Grapevine Virus A (GVA) by Cryotherapy and Electrotherapy. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 442-450.
- Ben-Amar, A., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G., y Mliki, A. 2013. Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. Scientia Horticulturae 157: 32-38.
- Benelli, C., De Carlo, A., y Engelmann, F. 2013a. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. Biotechnology Advances 31: 175-185.
- Benelli, C., De Carlo, A., y Engelmann, F. 2013b. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. Biotechnology Advances 31: 175-185.
- Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice. Critical Reviews in Plant Sciences 27: 141-219.
- Bettoni, J.C., Bonnard, R., Shepherd, A., Kretschmar, A.A., y Volk, G.M. 2019. Cryopreservation of grapevine (*vitis spp.*) shoot tips from growth chamber-sourced plants and histological observations. *Vitis - Journal of Grapevine Research* 58: 71-78.
- Bettoni, J.C., Costa, M.D., Gardin, J.P.P., Kretschmar, A.A., y Pathirana, R. 2016. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. Revista Brasileira de Fruticultura 38: .
- Bi, W.L., Pan, C., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Kher, M.M., Marković, Z., Wang, Q.C., y Teixeira da Silva, J.A. 2017. Cryopreservation of grapevine (*Vitis spp.*)—a review. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 53: 449-460.
- Bilodeau, P., Udvardi, M.K., Peacock, W.J., y Dennis, E.S. 1999. A prolonged cold treatment-

- induced cytochrome P450 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 22: 791-800.
- Cao, P.J., Bartley, L.E., Jung, K.H., y Ronald, P.C. 2008. Construction of a Rice Glycosyltransferase Phylogenomic Database and Identification of Rice-Diverged Glycosyltransferases. *Molecular Plant* 1: 858-877.
- Carrillo-Campos, J. 2019. Estructura y función de las oxigenasas tipo Rieske/mononuclear. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas 22: 1-12.
- Chauhan, R., Singh, V., y Quraishi, A. 2019. In vitro conservation through slow-growth storage. En *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*, pp. 397-416. Springer International Publishing.
- Chen, Y., Zhang, B., Li, C., Lei, C., Kong, C., Yang, Y., y Gong, M. 2019. A comprehensive expression analysis of the expansin gene family in potato (*Solanum tuberosum*) discloses stress-responsive expansin-like B genes for drought and heat tolerances. *PLOS ONE* 14: e0219837.
- Choi, C.S., y Sano, H. 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 589-600.
- Cosgrove, D.J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Cuevas Reyes, E., Carrillo Morales, M., y Treviño-Quintanilla, L.G. 2016. Evaluación de oligonucleótidos para medir expresión genética durante la marchitez bacteriana del tomate Article in *Revista fitotecnia mexicana* publ. por la Sociedad Mexicana de Fitogenética · Optimization of the culture medium of *Pycnoporus cinnabarinus* for the production of metabolites of biotechnological interest View project.
- Defalco, T.A. 2017. Regulation of Cyclic Nucleotide-Gated Channels and Plant Calcium Signaling.
- Di, W., Jiang, X., Xu, J., Jia, M., Li, B., y Liu, Y. 2018. Stress and damage mechanisms in *Dendrobium nobile* Lindl. protocorm-like bodies during pre- and post-liquid nitrogen exposure in cryopreservation revealed by iTRAQ proteomic analysis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2018 54:3 54: 253-272.
- Díaz, L. 2015. Criopreservación de yemas axilares de patata (*Solanum tuberosum* L.) por el método de encapsulación-deshidratación.
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A.N., y Gollack, D. 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* 52: 1969-1980.
- Drohat, A.C., y Coey, C.T. 2016. Role of Base Excision “Repair” Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chemical Reviews* 116: 12711-12729.
- Engelmann, F. 2011a. Cryopreservation of embryos: an overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 710: 155-184.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 427-433.

- Engelmann, F. 2011b. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. Springer 6-16.
- Esensee, V., Stushnoff, C., y Forsline, P.L. 2019. Cryopreservation of dormant grape (*Vitis sp.*) BUDS. HortScience 25: 1090e - 1090.
- Fabre, J., y Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. Cryo Letters 11: 413-426.
- Feng, X., Xu, Y., Peng, L., Yu, X., Zhao, Q., Feng, S., Zhao, Z. et al. 2019. TaEXPB7-B, a β -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Physiology 240: 153004.
- García-Coronado, H. 2015. Análisis de la regulación en la expresión de genes que codifican para adn metiltransferasas en embriones de uva (*Vitis vinifera*) cv. red globe criopreservados. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- García-Coronado, H., Báez-Flores, M., Troncoso-Rojas, R., Rivera-Domínguez, M., y Tiznado-Hernández, M.-E. 2016. Cryopreservation by Vitrification of *Vitis vinifera* cv. "Red Globe" Zygotic Embryos and Effect on the Expression of DNA Methyltransferase Genes . Journal of Agricultural Science and Technology 387-399.
- González-Arno, M., y Engelmann, F. 2013. Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales.
- Gonzalez-Benito, E.M., y Vidal, J. 2009. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars «Albariño» and «Tempranillo» oxidative damage and its effect on the decline and quality of plant germplasm conserved ex situ View project (MINECO/FEDER) View project.
- Guo, X., Xu, S., y Chong, K. 2017. Cold Signal Shuttles from Membrane to Nucleus. Molecular Cell 66: 7-8.
- Hamadina, E.I., y Ugbede, E.E. 2018. Yam tuber physiology View project Dormancy in Seeds of Hybrid Cassava Varieties (TMS 98/0505 and TMS 95/0379) Prior to Hardening of Seed Coat. International Journal of Agriculture and Forestry 8: 98-103.
- Hassan, N., y Haggag, A. 2013. Cryopreservation of Two Egyptian Grape (*Vitis vinifera*) Cultivars Using Two Steps Vitrification Protocol. World Applied Sciences Journal 28: 254-258.
- Hassan, N.A., Gomaa, A.H., Shahin, M.A., y El Homosany, A.A. 2013. In vitro Storage and Cryopreservation of Some Grape Varieties. Article in Journal of Horticultural Science.
- Huang, B., Zhang, J.M., Chen, X.L., Xin, X., Yin, G.K., He, J.J., Lu, X.X., y Zhou, Y.C. 2018. Oxidative damage and antioxidative indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification–cryopreservation procedure. Plant Cell Reports 37: 1325-1342.
- Jacob, P., Hirt, H., y Bendahmane, A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. Plant Biotechnology Journal 15: 405-414.
- Jitsopakul, N., Sangyojarn, P., Homchan, P., y Thammasiri, K. 2019. Efficiency of aluminum cryo-plates for cryopreservation of *Dendrobium signatum* Rchb. F. Pollinia. En *Acta Horticulturae*, pp. 279-286. International Society for Horticultural Science.
- Kalaiselvi, R., Rajasekar, M., y Gomathi, S. 2017. Cryopreservation of Plant Materials-A Review.

International Journal of Chemical Studies 560: 560-564.

- Kang, Y., Jang, S.W., Lee, H.J., Barchenger, D.W., y Jang, S. 2021. Expression profiling of heat shock protein genes as putative early heat-responsive members in lettuce. *Horticulturae* 7: 312.
- Kim, H.-H., y Lee, S.-C. 2012a. Personalisation' of Droplet-Vitrification Protocols for Plant Cells: A Systematic Approach to Optimising Chemical and Osmotic Effects. *Cryoletters* 33: 271-279.
- Kim, H.-H., y Lee, S.-C. 2012b. Personalisation' of Droplet-Vitrification Protocols for Plant Cells: A Systematic Approach to Optimising Chemical and Osmotic Effects Cryopreservation of endangered wild plant species in Korea View project Cryopreservation of coconut embryos View project.
- Lazo-Javalera, M.F., Tiznado-Hernández, M.E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., Rocha-Granados, M. del C., Martínez-Montero, M.E., y Rivera-Domínguez, M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification. *Data in Brief* 5: 549-555.
- Lazo Javalera, M.F., Tiznado Hernández, M.E., Vargas Arispuro, I., Martínez Téllez, M.Á., Islas Osuna, M.A., Hernández Oñate, M.Á., y Rivera Domínguez, M. 2016. Genetic Stability of Cryopreserved Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Genome by Vitrification Method. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 6: .
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Marković, Z., Chatelet, P., Preiner, D., Sylvestre, I., Kontić, J.K., y Engelmann, F. 2014. Effect of Shooting Medium and Source of Material On Grapevine (*Vitis Vinifera* L.) Shoot Tip Recovery After Cryopreservation.
- Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J.K., y Engelmann, F. 2013. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in vitro shoot tips. *Central European Journal of Biology* 8: 993-1000.
- Martin, L.B.B., Fei, Z., Giovannoni, J.J., y Rose, J.K.C. 2013. Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Frontiers in Plant Science* 4: .
- Matsumoto, T., y Sakai, A. 2003. Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica* 2003 131:3 131: 299-304.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology* 247: .
- Miaja, M.L., Gambino, G., Vallania, R., y Gribaudo, I. 2004. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. somatic embryos by vitrification or encapsulation-dehydration. En *Acta Horticulturae*, pp. 599-604. International Society for Horticultural Science.
- Miller, G., Coutu, J., Shulaev, V., y Mittler, R. 2018. Reactive Oxygen Signaling in Plants. En *Annual Plant Reviews online*, pp. 189-201. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Murasnige, T., y Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Agsays with Tohaoco Tissue Cultures.

- Muzi, C., Camoni, L., Visconti, S., y Aducci, P. 2016. Cold stress affects H⁺-ATPase and phospholipase D activity in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 328-336.
- Nah, G., Lee, M., Kim, D.-S., Rayburn, A.L., Voigt, T., y Lee, D.K. 2016. Transcriptome Analysis of *Spartina pectinata* in Response to Freezing Stress Subudhi, P. K. (ed.),. PLOS ONE 11: e0152294.
- Naing, A.H., y Kim, C.K. 2019. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. *3 Biotech* 9: .
- Nakkanong, K., y Nualsri, C. 2018. Cryopreservation of *Hevea brasiliensis* zygotic embryos by vitrification and encapsulation-dehydration. *Journal of Plant Biotechnology* 45: 333-339.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. et al. 2008. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 2008 452:7186 452: 483-486.
- Niino, T., y Arizaga, M.V. 2015. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science* 65: 41-52.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., y Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67-73.
- Nuc, K., Marszałek, M., y Pukacki, P.M. 2016. Cryopreservation changes the DNA methylation of embryonic axes of *Quercus robur* and *Fagus sylvatica* seeds during in vitro culture. *Trees - Structure and Function* 30: 1831-1841.
- Olomola, D., Aguda, S., Olorode, E., Oyediran, R., y EA, A. 2019. The Application Of Biotechnology In Biodiversity Conservation.
- Ozudogru, E.A., y Lambardi, M. 2016. Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. *Methods in Molecular Biology* 1359: 537-550.
- Ozudogru, E.A., Previati, A., y Lambardi, M. 2010. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 589: 303-324.
- Pandian, B.A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P.V.V., y Jugulam, M. 2020. Role of Cytochrome P450 Enzymes in Plant Stress Response. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 454 9: 454.
- Panis, B. 2019. Sixty years of plant cryopreservation: From freezing Hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. En *Acta Horticulturae*, pp. 1-8. International Society for Horticultural Science.
- Parrilla-Doblas, J.T., Roldán-Arjona, T., Ariza, R.R., y Córdoba-Cañero, D. 2019. Active DNA Demethylation in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 4683 20: 4683.
- Pathak, M.R., y Abido, M.S. 2014. The Role of Biotechnology in the Conservation of Biodiversity. *Plant Tissue Culture The Role Of Biotechnology In The Conservation Of Biodiversity*.
- Penfield, S., y MacGregor, D. 2013. Temperature sensing in plants. En *Temperature and Plant Development*, pp. 1-18. John Wiley & Sons, Inc, Oxford.
- Pérez-Cruz, D.C., y Gomez-Marin, J.E. 2009. Evaluación de tres métodos de extracción de ARN

de *Candida albicans* (cepa de referencia IP 118079). Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Quindío, Colombia.

- Pukacki, P.M., y Juszczak, K. 2015. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. *Trees* 29: 385-396.
- Rall, W.F., y Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
- Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136-145.
- Reed, B.M. 2017. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 53: 285-288.
- Reilly, K., Diana, A.E., Ae, B., Cortés Ae, D.F., Gó Mez-Vá, R., Joe, A.E., Ae, T. et al. 2007. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol Biol* 64: 187-203.
- Ren, L., Zhang, D., Chen, G. qun, Reed, B.M., Shen, X. hui, y Chen, H. ying. 2015a. Transcriptomic profiling revealed the regulatory mechanism of *Arabidopsis* seedlings response to oxidative stress from cryopreservation. *Plant Cell Reports* 34: 2161-2178.
- Ren, L., Zhang, D., Chen, G. qun, Reed, B.M., Shen, X. hui, y Chen, H. ying. 2015b. Transcriptomic profiling revealed the regulatory mechanism of *Arabidopsis* seedlings response to oxidative stress from cryopreservation. *Plant Cell Reports* 34: 2161-2178.
- SADER. 2019. Síntesis Informativa. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural30. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura>.
- SAGARHPA. 2018. Sonora es líder en la producción nacional de uva. 21 de agosto de 20185. Disponible en: <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/notas/econo/uva.pdf> [Accedido 14 de diciembre de 2019].
- Sakai, A., Hirai, D., y Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. En *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, pp. 33-57. Springer New York.
- Sakai, A., Kobayashi, S., y Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification.
- Sampedro, J., Guttman, M., Li, L.C., y Cosgrove, D.J. 2015. Evolutionary divergence of β -expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits. *The Plant Journal* 81: 108-120.
- Schneidee, A., y Raimondi, S. 2014. Preservation and characterization of *Vitis vinifera* cultivated germplasm. en exploitation of autochthonous and more common vine varieties - oenoviti international network, pp. 16-21. Grugliasco, Italy.
- Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-mazra'awi, M., Shahrour Wesam, y Arebiat, A. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry* 35: 173-184.
- SIAP. 2020. Más uva mexicana para el mundo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>.

- Sierla, M., Hörak, H., Overmyer, K., Waszczak, C., Yarmolinsky, D., Maierhofer, T., Vainonen, J.P. et al. 2018. The Receptor-like Pseudokinase GHR1 Is Required for Stomatal Closure. *The Plant Cell* 30: 2813-2837.
- Sinha, S., Kukreja, B., Arora, P., Sharma, M., Pandey, G.K., Agarwal, M., y Chinnusamy, V. 2015. The omics of cold stress responses in plants. En *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspectives*, Volume 2, pp. 143-194. Springer New York.
- Song, G., Zhang, R., Zhang, S., Li, Y., Gao, J., Han, X., Chen, M. et al. 2017. Response of microRNAs to cold treatment in the young spikes of common wheat. *BMC genomics* 18: 212.
- Soto-Sedano, C.J., y López-Carrascal, C.E. 2012. *RNA-seq*: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno.
- Sturm, A., Lienhard, S., Schatt, S., y Hardegger, M. 1999. Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota L.*). *Plant Mol Biol* 39: 349-360.
- Tanaka, D., Niino, T., y Uemura, M. 2018. Cryopreservation of plant genetic resources. En *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 355-369. Springer New York LLC.
- Tao, X., Wang, M.X., Dai, Y., Wang, Y., Fan, Y.F., Mao, P., y Ma, X.R. 2017. Identification and expression profile of cypome in perennial ryegrass and tall fescue in response to temperature stress. *Frontiers in Plant Science* 8: 1519.
- Thangella, P.A.V., Pasumarti, S.N.B.S., Pullakhandam, R., Geereddy, B.R., y Daggu, M.R. 2018. Differential expression of leaf proteins in four cultivars of peanut (*Arachis hypogaea L.*) under water stress. *3 Biotech* 8: 1-21.
- Trujillo, I., Subero, B., y Silva, A. 2019. Conservación *in vivo* e *in vitro* de germoplasma vegetal en escuelas de los Altos Mirandinos. *Rev. Tekhné* 22: 63-068.
- Uchendu, E.E., Shukla, M., Praveen, S., y Keller, J.E.R. 2016. Cryopreservation of potato microtubers: the critical roles of sucrose and desiccation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 124: 649-656.
- Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M., y Takahashi, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8: 418-421.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.F., Nishimura, N., Chan, W.Y., Valerio, G., Lamminmäki, A. et al. 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 2008 452:7186 452: 487-491.
- Vasanth, K., y Vivier, M.A. 2011. Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine. *Biologia plantarum* 55: 365-369.
- Vaught, J. 2019. Climate change, biodiversity, and biopreservation. *Biopreservation and Biobanking* 17: 273.
- Verhoeven, A., García-Plazaola, J.I., y Fernández-Marín, B. 2018. Shared mechanisms of photoprotection in photosynthetic organisms tolerant to desiccation or to low temperature. *Environmental and Experimental Botany* 154: 66-79.
- Volk, G.M., Henk, A., y Basu, C. 2011. Gene expression in response to cryoprotectant and liquid

nitrogen exposure in Arabidopsis shoot tips. En Acta Horticulturae, pp. 55-66. International Society for Horticultural Science.

- Wang, L., Zhu, W., Fang, L., Sun, X., Su, L., Liang, Z., Wang, N. et al. 2014. Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in *Vitis vinifera*. BMC Plant Biology 14: 103.
- Wang, M.-R., Zhang, Z., Zámečník, J., Bilavčík, A., Blystad, D.-R., Haugslien, S., y Wang, Q.-C. 2019. Droplet-vitrification for shoot tip cryopreservation of shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*): effects of PVS3 and PVS2 on shoot regrowth. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2019 140:1 140: 185-195.
- Wang, M., Zou, Z., Li, Q., Xin, H., Zhu, X., Chen, X., y Li, X. 2017. Heterologous expression of three *Camellia sinensis* small heat shock protein genes confers temperature stress tolerance in yeast and *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 36: 1125-1135.
- Wang, P., Guo, Y., Wang, Y., y Gao, C. 2020. Vacuolar membrane H⁺-ATPase c⁺ subunit gene (ThVHAc⁺1) from *Tamarix hispida* Willd improves salt stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry 157: 370-378.
- Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E., y Perl, A. 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. Plant Science 162: 551-558.
- Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., y Tanne, E. 2003. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. Plant Science 165: 321-327.
- Wang, Q., Tanne, E., Arav, A., y Gafny, R. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2000 63:1 63: 41-46.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., y Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science 9: 244-252.
- Waseem, M., Huang, F., Wang, Q., Aslam, M.M., Abbas, F., Ahmad, F., Ashraf, U. et al. 2021. Identification, methylation profiling, and expression analysis of stress-responsive cytochrome P450 genes in rice under abiotic and phytohormones stresses. GM Crops and Food.
- Withers, L.A., y Engels, J.M.M. 1990. The test tube genebank - a safe alternative to field conservation. IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific 1-2.
- Yang, J., Gao, L., Liu, M., Sui, X., Zhu, Y., Wen, C., y Zhang, L. 2020. Advanced Biotechnology for Cell Cryopreservation. Transactions of Tianjin University 26: 409-423.
- Yang, Q.S., Gao, J., He, W. Di, Dou, T.X., Ding, L.J., Wu, J.H., Li, C.Y. et al. 2015. Comparative transcriptomics analysis reveals difference of key gene expression between banana and plantain in response to cold stress. BMC Genomics 16: 1-18.
- Zelicourt, A., Colcombet, J., y Hirt, H. 2016. The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. Trends in Plant Science 21: 677-685.
- Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann Florent, Chen, R.C., y Zhao, Y. 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved in vitro cultured grape and kiwi shoot-tips using

RAPD. *Biotechnology Advances* 24: 175-185.

Zhang, D., Ren, L., Chen, G. qun, Zhang, J., Reed, B.M., y Shen, X. hui. 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: 1499-1513.

Zhang, H., Zhang, Y., Deng, C., Deng, S., Li, N., Zhao, C., Zhao, R. et al. 2018. The *Arabidopsis* Ca²⁺-Dependent Protein Kinase CPK12 Is Involved in Plant Response to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 4062.

Zhang, J.H., Liu, Y.P., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Wang, X.Q., y Huang, W.D. 2006. Changes in membrane-associated H⁺-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science* 170: 768-777.

Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F., y Zhou, M. 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. *Cryo Letters* 22: 321-328.

Zhu, J.K. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167: 313-324.