



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

**EFFECTOS DEL PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN EN  
LA PARED CELULAR Y EXPRESIÓN DEL GEN  
EXPANSINA- $\alpha$ 1 DE *Vitis vinifera* L.**

---

Por:

**Deanna Esquivel Figueroa**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

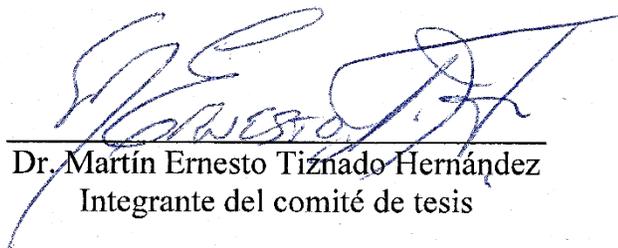
## APROBACIÓN

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



---

Dra. Marisela Rivera Domínguez  
Directora de Tesis



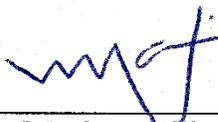
---

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. María Fernanda Lazo Javalera  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efectos del Protocolo de Crioconservación en la Pared Celular y Expresión del Gen Expansina- $\alpha 1$  de *Vitis vinifera* L." 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 Deanna Esquivel Figueroa, 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 director(a) de tesis.



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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", written over a horizontal line.

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 la Dra. Marisela Rivera Domínguez por abrirme las puertas a su laboratorio. Además, por compartirme de su conocimiento, tiempo y apoyo completo para realizar mis estudios de maestría.

A mi Comité de Tesis por aceptarme como su alumna y por su valiosa contribución para la realización de este proyecto.

A la Q.B. Karen Rosalinda Astorga Cienfuegos por su apoyo técnico para la realización de este proyecto.

Al Dr. Christian Minjarez Osorio por sus enseñanzas y permitirme realizar los análisis de histología dentro de su laboratorio.

A la Dra. Cristina Ibarra Zazueta por darme la oportunidad de utilizar el equipo de microscopía para la observación y captura de imágenes de los cortes histológicos.

A Noé Romero y Renata Vásquez por su amistad y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos Víctor Gutiérrez, Eduardo Cienfuegos, Lily Almaguer, Amy Espinosa, Madelline Alcántara y Esaú García por su amistad a pesar de la distancia.

A Andrea Beatriz López por su gran amistad que ha perdurado tantos años.

A Héctor Ruiz por su amistad y apoyo durante la maestría.

A mi novio Antonio por su gran apoyo y cariño que siempre me ha dado.

A mi sobrina Melissa por siempre retarme y ser una alegría en mi vida.

A mi familia por su gran apoyo constante y comprensión durante este tiempo.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá y mi sobrina Regina,  
las personas más importantes en mi vida.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>LISTA DE FORMULAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	16
2.1. Importancia de la Conservación de Vid.....	16
2.1.1. Variedades de Vid.....	16
2.1.2. Importancia Agronómica del Cultivo.....	18
2.1.3. Estrés Biótico y Abiótico que Afectan al Cultivo de Vid.....	20
2.2. Conservación Actual del Germoplasma de Vid.....	22
2.2.1. Criopreservación de Tejidos Vegetales.....	23
2.2.2. Etapas de la Criopreservación que Provocan Alteraciones al Tejido.....	23
2.2.2.1. Enfriamiento y recalentamiento del tejido.....	24
2.2.2.2. Pretratamiento y deshidratación del tejido.....	24
2.2.2.3. Compuestos tóxicos de las soluciones de vitrificación.....	25
2.3. Alteraciones Ocasionadas por la Criopreservación en Plantas.....	27
2.3.1. Alteraciones Bioquímicas.....	28
2.3.2. Cambios Moleculares.....	28
2.3.3. Modificaciones Celulares.....	30
2.4. Análisis Histológicos para la Identificación de Cambios Celulares Relacionados con Criopreservación.....	33
2.4.1. Estudios Histológicos en Tejidos Vegetales Criopreservados.....	33
2.4.2. Tinciones para el Análisis Histoquímico de Tejidos Vegetales Criopreservados....	38
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	41
4.1. Objetivo General.....	41
4.2. Objetivos Específicos.....	41
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1. Protocolo de Criopreservación de Vid.....	42
5.1.1. Preparación del Material Vegetal.....	42
5.1.2. Extracción de Embriones Cigóticos de Vid.....	42

## CONTENIDO (continuación)

5.1.3. Crioconservación por Vitricación.....	44
5.1.4. Recalentamiento.....	44
5.2. Análisis de Viabilidad de los Embriones.....	45
5.2.1. Análisis de Viabilidad Mediante Cloruro de Tetrazolio.....	45
5.2.2. Regeneración de Plántulas.....	46
5.3. Análisis Histológico de la Membrana y Pared Celular.....	46
5.3.1. Preparación de los Cortes Histológicos.....	46
5.3.2. Tinción de Tejidos.....	47
5.3.3. Análisis de Imagen.....	47
5.4. Análisis de Expresión Génica.....	48
5.5. Análisis Estadístico.....	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
6.1. Análisis de Viabilidad en Embriones Cigóticos de Vid Durante la Crioconservación.....	49
6.2. Análisis Histológico e Histoquímico en Embriones Cigóticos de Vid Crioconservados...	54
6.2.1. Análisis Histológico y Determinación del Porcentaje de Plasmólisis.....	54
6.2.2. Análisis Histoquímico para la Determinación de la Distribución de Polisacáridos y Celulosa.....	59
6.3. Análisis de la Expresión del Gen EXPA1 Durante la Crioconservación en Embriones Cigóticos de Vid.....	64
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Principales variedades de uva de mesa producidas en México.....	17
2	Producción anual de uva de mesa en México.....	19
3	Principales municipios productores de uva de mesa en Sonora.....	19
4	Factores bióticos y abióticos que afectan el crecimiento de vid.....	21
5	Posibles modificaciones celulares que podrían provocar algunos pasos en el proceso de la crioconservación.....	32
6	Análisis de viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe durante su crioconservación.....	50
7	Porcentajes de viabilidad de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe durante su crioconservación.....	52
8	Cortes histológicos de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> L. cv. Red Globe teñidos con azul de toluidina.....	55
9	Porcentaje de plasmólisis en cortes histológicos de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> L. cv. Red Globe teñidos con azul de toluidina.....	57
10	Comparación entre el porcentaje de plántulas regeneradas, porcentaje de embriones cigóticos viables y el porcentaje de plasmólisis en cortes histológicos de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> L. cv. Red Globe.....	58
11	Cortes histológicos de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> L. cv. Red Globe teñidos con PAS.....	61
12	Cortes histológicos de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> L. cv. Red Globe teñidos con rojo congo.....	63
13	Expresión del gen EXPA1 durante el protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe.....	65
14	Comparación entre la expresión del gen EXPA1 y porcentaje de plasmólisis durante el protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe.....	66

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Alteraciones ocasionadas por la criopreservación en tejidos vegetales.....	27
2	Hallazgos histológicos en tejidos vegetales criopreservados.....	34
3	Distribución de muestras para los análisis de viabilidad, histología y expresión génica.....	43

## LISTA DE FÓRMULAS

<b>Fórmula</b>		<b>Página</b>
1	Porcentaje de viabilidad.....	45
2	Porcentaje de plasmólisis.....	47

## RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los principales cultivos del estado de Sonora, pero está en constante peligro por diversos factores bióticos y abióticos. Por lo tanto, la conservación de su germoplasma a largo plazo es de gran importancia, y la crioconservación es una alternativa viable. Desafortunadamente, se ha demostrado que los procedimientos de crioconservación pueden provocar cambios fisiológicos, moleculares y bioquímicos sobre los tejidos. Aún no se han descrito los cambios citotóxicos que puede provocar la crioconservación sobre los embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. Por lo que, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto sobre la viabilidad del tejido, las alteraciones celulares a nivel de membrana y pared celular mediante histología e histoquímica y, la expresión del gen expansina- $\alpha$ 1 en respuesta al proceso de crioconservación. La evaluación de la viabilidad del tejido (V) y la regeneración de plántulas (RP), mostró que la exposición combinada a la solución de vitrificación vegetal 2 (PVS2) y nitrógeno líquido (NL) ocasionó disminución de la viabilidad y regeneración del tejido (V: 68%; RP: 52%). El mismo efecto se observó cuando el tejido fue expuesto a PVS2, NL y recalentamiento (RC) (V: 68%; RP: 0%). Sin embargo, la viabilidad y la regeneración aumentó cuando se sometió el tejido a PVS2, NL, RC y solución de descarga (SD) (V: 92%; RP: 60%). El análisis histológico reveló que los procesos de enfriamiento (PVS2+NL) y recalentamiento (PVS2+NL+RC) dentro del protocolo de crioconservación provocan disrupción celular, conglomeración de los componentes del citoplasma y aumento de polisacáridos y celulosa en el espacio intercelular. Además, el porcentaje de plasmólisis aumentó por el uso combinado de PVS2 y el enfriamiento (PVS2+NL) (56.4%) y disminuyó con el uso de la solución de descarga después del recalentamiento (PVS2+NL+RC+SD) (44.7%). La expresión del gen expansina- $\alpha$ 1 se vio reprimida por el enfriamiento con nitrógeno líquido (PVS2+NL) e inducido por el uso de la PVS2. Estos resultados indican que las distintas etapas del protocolo de crioconservación en embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe provocan alteraciones citotóxicas a nivel de membrana y pared celular. La crioprotección causó plasmólisis y un aumento en la expresión del gen expansina- $\alpha$ 1 debido a la expansión celular.

**Palabras clave:** vid, membrana celular, expansina- $\alpha$ 1, histología, histoquímica.

## ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the main crops in the state of Sonora. However, it is in constant danger due to various biotic and abiotic factors. Therefore, the long-term conservation of its germplasm is of great importance, with cryopreservation being a suitable technique to conserve this cultivar. Unfortunately, cryopreservation procedures have been shown to cause physiological, molecular, and biochemical tissue damage. The cytotoxic damage that cryopreservation can cause on zygotic embryos of grapevine cv. Red Globe is still yet to be described. Therefore, the objective of this investigation is to analyze the effect on tissue viability, cell damage at the plasma membrane and cell wall level by histology and histochemistry, as well as the expression of the expansin- $\alpha$ 1 gene in response to the cryopreservation process. The evaluation of tissue viability (V) and plantlet regeneration (PR) showed that the combined exposure to the plant vitrification solution 2 (PVS2) solution and liquid nitrogen (LN) caused viability and tissue regeneration to decrease (V: 68%; PR: 52%). The same effect was observed when the tissue was exposed to PVS2, LN and rewarming (RC) (V: 68%; PR: 0%). However, viability and regeneration increased when the tissue was subjected to PVS2, NL, RC and unloading solution (SD) (V: 92%; PR: 60%). The histological analysis revealed that the cooling (PVS2+NL) and rewarming (PVS2+NL+RC) processes within the cryopreservation protocol cause cell disruption, conglomeration of cytoplasmic components, increase in polysaccharides and cellulose in the intercellular space. In addition, the percentage of plasmolysis was increased by the combined use of PVS2 and cooling (PVS2+NL) (56.4%) and decreased by the use of the unloading solution after rewarming (PVS2+NL+RC+SD) (44.7%). Expansin- $\alpha$ 1 gene expression was repressed by liquid nitrogen cooling (PVS2+NL) and induced by the use of PVS2. These results indicate, that the different stages of the cryopreservation protocol in zygotic embryos of *V. vinifera* L. cv. Red Globe cause cytotoxic alterations at the level of the membrane and cell wall. Cryoprotection caused plasmolysis and an increase in expansin- $\alpha$ 1 gene expression due to cell expansion.

**Keywords:** grapevine, plasma membrane, expansin-  $\alpha$ 1, histology, histochemistry.

## 1. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más importantes en el mundo, ya que es cultivada para la producción de vinos, jugos y para el consumo del fruto fresco o seco (Creasy y Creasy, 2018). Los principales países cultivadores de uva a nivel mundial son: China, Italia, Estados Unidos de América, España, Francia, Turquía, India y Chile (FAOSTAT, 2019). En el estado de Sonora se cosecha aproximadamente el 67% (339,140 toneladas) de la producción anual de uva de mesa que hay en México (SIAP, 2020). Desafortunadamente, la sequía, el exceso de riego, los cambios extremos de temperatura y la presencia de patógenos son los principales factores bióticos y abióticos que afectan el desarrollo, por lo que la conservación de su material genético es de gran importancia agronómica y económica (Morales Cruz *et al.*, 2021).

La criopreservación es una técnica que permite conservar tejidos vegetales a largo plazo, al enfriar las células con nitrógeno líquido (NL) a una temperatura de -196 °C con el uso de soluciones crioprotectoras (González-Arno *et al.*, 2014; Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, esta técnica puede inducir cambios bioquímicos, fisiológicos y moleculares que ocasionan modificaciones genéticas y epigenéticas (Kaity *et al.*, 2008; Rahmah *et al.*, 2015; Zakaria *et al.*, 2020). Esto, aún es un tema de controversia, ya que varios trabajos reportan que la criopreservación es una técnica eficiente, mientras que otros mencionan lo contrario, como se describe a continuación.

Wang *et al.* (2004) indican que la criopreservación es una técnica altamente eficiente para la conservación de células embriónicas. Sin embargo, Martínez-Montero *et al.* (2002) reportaron fuga de electrolitos, peroxidación de lípidos y un incremento de proteínas relacionadas a la membrana, después de la criopreservación de callos embriónicos de caña de azúcar. Además, Lazo-Javalera *et al.* (2016) reportó que la criopreservación y el uso de calor durante el recalentamiento provocan cambios en la variabilidad genética en tejidos de la vid. También, se ha reportado que el uso de crioprotectores ayuda a mantener estable la actividad enzimática de superóxido dismutasa y catalasa en yemas auxiliares de la vid. Sin embargo, los autores reportaron un aumento de malondialdehído posiblemente debido a la deshidratación del tejido, lo cual provoca un desbalance en las membranas celulares (Lazo-Javalera *et al.*, 2015). De acuerdo con esta información, sobre el desbalance bioquímico y cambios moleculares que ocasionan algunos pasos del protocolo de criopreservación, también es importante tomar en cuenta los cambios estructurales

que puede ocasionar cada uno de los pasos de la criopreservación.

Da Silva Cordeiro *et al.* (2020), observaron en los cortes histológicos de raíz *Tarenaya roseae* expuestos a criopreservación y vitrificación con la solución de vitrificación vegetal 3 (PVS3), aumento de plasmólisis por el uso de la solución de vitrificación y aumento del espacio intercelular durante la criopreservación. La presencia de plasmólisis puede ser una alteración nociva para la célula, ya que es un proceso donde hay una pérdida excesiva de agua y provoca la separación de la pared y membrana celular, lo que conlleva a la muerte celular. Además, el análisis histoquímico reveló la presencia de polisacáridos, proteínas, lípidos y pectinas en el espacio intercelular. Similarmente, Zakaria *et al.* (2020), en su análisis histológico de cuerpos similares a protocormos (PLBs) de orquídea criopreservados con encapsulación-deshidratación, mostraron una disminución de la viabilidad del tejido por el grado de plasmólisis presente como consecuencia de la deshidratación y ruptura de células después de la exposición a NL. Hasta el momento no se ha descrito a detalle las alteraciones que puede ocasionar la criopreservación a la integridad celular de los embriones cigóticos de la vid.

Debido a los diversos procesos de estrés a los que se somete el tejido durante los procedimientos de la criopreservación, es posible que ocurran cambios en la integridad de la pared celular y la membrana plasmática. Se conoce que las técnicas de microscopía permiten observar la estructura de la pared celular de los tejidos, por lo que es posible identificar la presencia de modificaciones celulares (Kuki *et al.*, 2017). De manera que, al describir las alteraciones que se pudieran presentar en diferentes tejidos criopreservados de *V. vinifera* L., permitirá dilucidar las posibles alteraciones que pueda ocasionar la criopreservación a la integridad celular y definir sus causas. Finalmente, los hallazgos de este estudio darán un mayor enfoque sobre ciertos componentes de la pared y membrana celular que puedan presentar alguna alteración en las diferentes etapas del protocolo de criopreservación, lo cual ayudará en el desarrollo de protocolos óptimos y evitar alteraciones a los tejidos como consecuencia de la criopreservación.

## 2. ANTECEDENTES

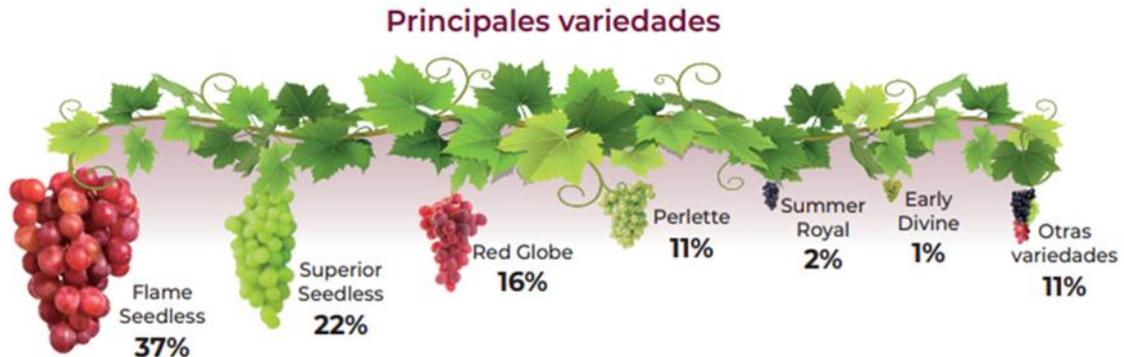
### 2.1. Importancia de la Conservación de Vid

La vid es una planta trepadora, que con sus tallos y zarcillos se enrosca en un soporte en busca de luz. Pertenece a la familia *Vitaceae*, que principalmente son plantas leñosas y lianas. La parte aérea se compone del tronco, las ramas, las hojas y los brotes. La vid puede soportar las heladas invernales, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 15 a 20 °C (Creasy y Creasy, 2018). El fruto de la vid es la uva, la cual tiene una forma esférica, carnosa y es muy jugosa. Además, es una fruta rica en vitaminas A, C, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>6</sub>, y en minerales como el calcio, magnesio y hierro, entre otros (SAGARPA, 2017). También, se ha mostrado que la uva posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias para prevenir ciertas enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer y disfunción de la vejiga urinaria (Colombo *et al.*, 2019; Pezzuto, 2008). Debido al gran valor nutritivo, propiedades y sabor, la vid es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial.

#### 2.1.1. Variedades de Vid

La uva posee una cáscara delgada y resistente, que puede variar de color dependiendo de la variedad. Existen aproximadamente 10,000 variedades de uva a nivel mundial (Creasy y Creasy, 2018). Las principales variedades de la vid que son cultivadas en México son Perlette, Superior, Flame Seedless y Red Globe (**Figura 1**). Donde el 37% de la producción de la uva en México fue de la variedad Flame Seedless, 22% de la variedad Superior, 16% de la variedad Red Globe y 11% de la variedad Perlette (SIAP, 2022). Estas cuatro variedades son consumidas principalmente de manera fresca, pero también se pueden utilizar para elaborar vinos, jugos y uva pasas (Creasy y Creasy, 2018).

## Uva de mesa



**Figura 1.** Principales variedades de uva de mesa producidas en México. (Fuente: SIAP, 2022)

La variedad Perlette tiene una forma esférica de color verde-amarilla, y posee una pulpa crujiente y un sabor neutro. Además, es una variedad con buena productividad, ya que es la primera uva de temporada. Principalmente, se consume el fruto fresco, pero también se utiliza el fruto seco en la repostería para la elaboración de postres (Thakur *et al.*, 2010). Al igual que la variedad Perlette, la variedad Superior ó Sugraone, tiene una cáscara de color verde-amarilla, una pulpa crujiente, jugosa y sin semilla. Sin embargo, la forma de la baya es cónica a diferencia de la variedad Perlette, que es de forma esférica. La variedad Superior es una de las principales variedades consumidas de forma fresca por su sabor dulce, que se debe a la presencia de geraniol (Hellín *et al.*, 2010). A pesar de que estas variedades son denominadas sin semilla, se encuentran semillas parcialmente formadas causadas por un aborto del embrión después de la fertilización de la flor que fue polinizada. A este fenómeno se le denomina estenospermocarpia, y es algo que ocurre en muchas variedades de uvas que son sin semilla (Creasy y Creasy, 2018).

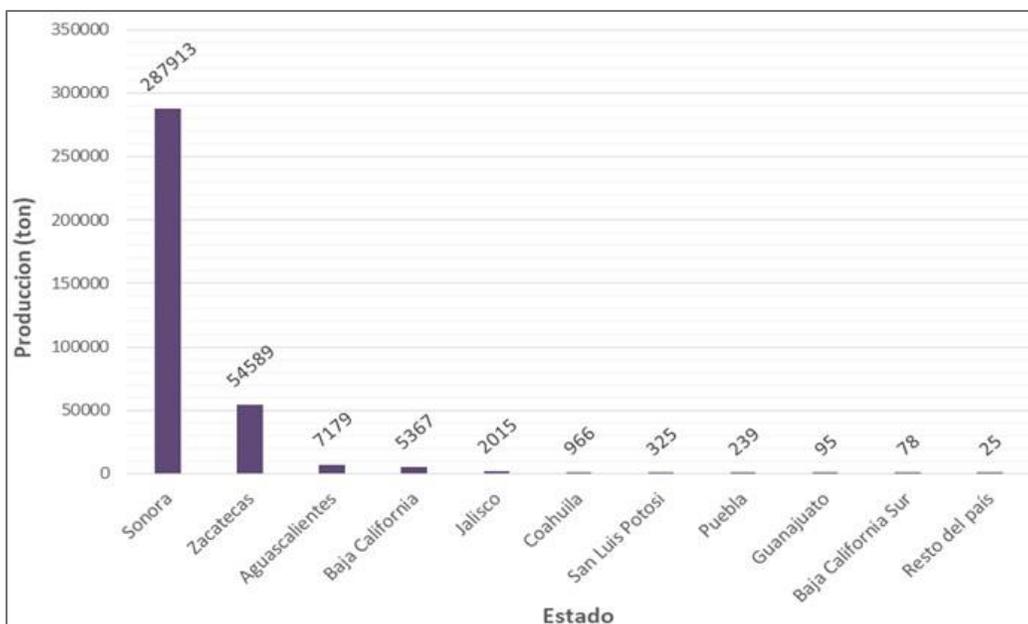
A diferencia de las variedades Perlette y Superior, las variedades Flame Seedless y Red Globe tienen una cáscara de color rojo oscuro, en ambas la baya es de forma esférica y su textura es crujiente. Sin embargo, existen algunas diferencias entre estas dos variedades. Principalmente, la variedad Flame Seedless no presenta semillas en su interior; mientras que, la variedad Red Globe si tiene semillas, lo cual es una de sus principales características. Otra diferencia es su tamaño, ya que la variedad Red Globe se caracteriza por ser grande y la variedad Flame Seedless es más pequeña. Flame Seedless es la variedad más popular de las cuatro descritas, debido a su sabor dulce

y que no contiene semillas (Alenazi *et al.*, 2019; Creasy y Creasy, 2018).

Aunque, solo el 16% de la producción anual de la uva en Sonora es de la variedad Red Globe, esto no significa que sea una variedad de poca importancia (SIAP, 2022). Esto debido a que, las semillas de Red Globe presentan mayor contenido de flavonoides, fenoles y minerales en comparación con la cáscara y la pulpa de la uva (Özcan *et al.*, 2017). Se ha descrito que estos compuestos brindan a la uva propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Además, esto permite que la uva sea útil para la prevención de enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Alzheimer y disfunción de la vejiga urinaria (Colombo *et al.*, 2019; Pezzuto, 2008). Asimismo, la conservación del germoplasma por medio del embrión cigóticos, obtenido solo de la semilla, permite conservar la diversidad genética de este cultivar (Walters *et al.*, 2008). Por otra parte, evidencias experimentales generadas por García-Coronado (2015) permiten concluir que gran parte de las semillas de uva de esta variedad cultivada en el estado de Sonora, produce semillas que no completaron su desarrollo y no poseen endospermo y/o embrión cigótico. Por lo tanto, su conservación es de gran importancia por los diversos compuestos benéficos que contiene.

### **2.1.2. Importancia Agronómica del Cultivo**

La vid es uno de los cultivos más importantes en el mundo, ya que puede ser utilizada para la elaboración de vinos, jugos, uva pasa y el consumo de la uva de mesa. Además, es de gran importancia económica; sobre todo en los principales países viticultores como China, Italia, Estados Unidos de América, entre otros (FAOSTAT, 2019). En el año 2021 en México, se cosecharon 358,790 toneladas de uva (**Figura 2**). Aproximadamente el 80.25% (339,140 toneladas) de esa producción fue en el estado de Sonora, lo que equivale a aproximadamente 8,638 millones de pesos de valor agrícola para el estado (SIAP, 2022). Siendo Hermosillo (111,196 toneladas) el principal municipio productor de uva de mesa en Sonora, seguido por Caborca, San Miguel de Horcasitas, Carbó, entre otros (**Figura 3**) (SIAP, 2022). Por lo que, estos datos posicionan a Sonora como el principal productor de uva mesa en México.



**Figura 2.** Producción anual de uva de mesa en el año 2021 en México.

Rank	Municipio	Volumen (toneladas)
<b>Sonora</b>		
<b>Total estatal</b>		<b>287,913</b>
1	Hermosillo	111,196
2	Caborca	71,172
3	San Miguel de Horcasitas	50,546
4	Carbó	21,508
5	Guaymas	16,918
6	Empalme	9,666
7	Bácum	3,045
8	Cajeme	1,472
9	Altar	1,310
10	Pitiquito	1,050
11	San Ignacio Río Muerto	31

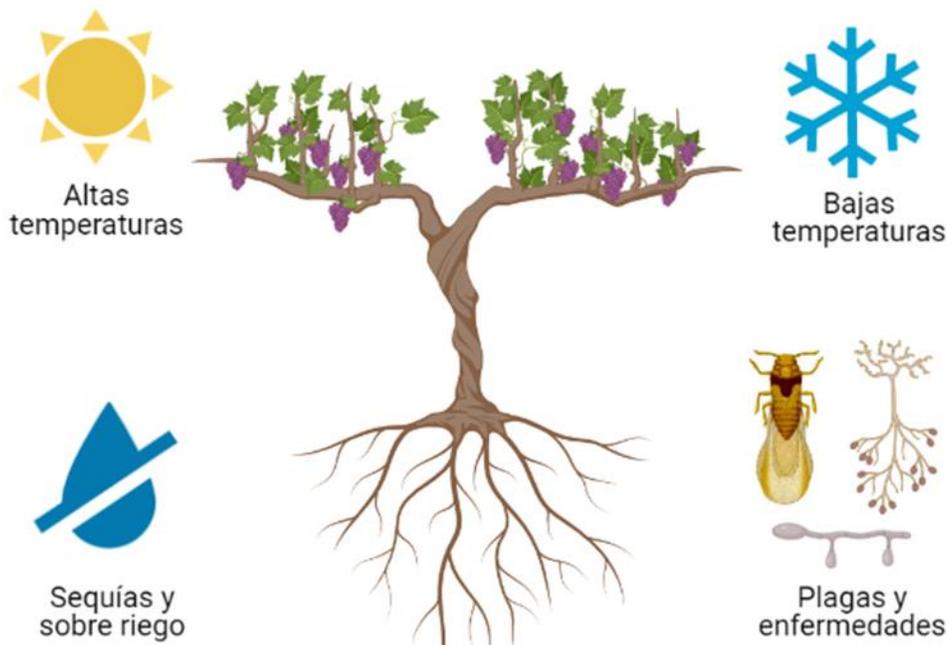
**Figura 3.** Principales municipios productores de uva de mesa en Sonora. (Fuente: SIAP, 2022)

Debido a la importancia del cultivo de la vid, SAGARPA (2017) realizó un estudio donde se estima la producción, exportación y valor de las exportaciones de la uva para los años 2024 y 2030. Este estudio muestra que posiblemente para el año 2024 va a haber una producción de 415.43 miles de toneladas de uva, y para el año 2030 una producción de 463.51 miles de toneladas. En cuanto a las exportaciones de este cultivo, se estima que en el año 2024, 191.59 miles de toneladas serán

exportadas, y para el año 2030, 213.62 miles de toneladas. Estas exportaciones equivalen a un valor de 198.78 millones de dólares (precio del dólar del 2016) para el año 2024, y 221.64 millones de dólares para el año 2030. Además, se espera que entre el año 2016 y 2030 el cultivo de la vid tenga un crecimiento de producción anual del 1.86%, y de exportaciones un aumento del 2.06%. Sin embargo, existen diversos factores bióticos y abióticos que podrían interferir en cumplimiento de estas estimaciones.

### **2.1.3. Estrés Biótico y Abiótico que Afectan al Cultivo de Vid**

La vid es una planta que requiere de diferentes condiciones para tener un crecimiento óptimo. Necesita una temperatura de 15 a 20 °C y suelos franco-arenosos con un pH de 5.5 a 7.0, para la maduración de sus racimos (Creasy y Creasy, 2018). Desafortunadamente, existen diversos factores bióticos y abióticos que limitan o detienen el crecimiento adecuado de la vid. Estos son las altas temperaturas, heladas, sequías, sobre riego, plagas y enfermedades (**Figura 4**) (Liu *et al.*, 2012; Morales Cruz *et al.*, 2021). Por esta razón, es que la conservación de la vid es de gran importancia para evitar pérdidas de su material genético. El principal factor biótico que afecta el crecimiento de la vid son las plagas y las enfermedades que éstas causan. La vid es altamente susceptible a infecciones por *Daktulosphaira vitifoliae* (filoxera), *Plasmopara vitícola* y *Erysiphe necátor*, los cuales provocan plagas, mildiú polvoriento y veloso, respectivamente (Morales Cruz *et al.*, 2021). Se ha visto que la luz solar y compuestos como el sulfuro y el cobre pueden inhibir el crecimiento del mildiú polvoriento y veloso. También, se han utilizado fungicidas para el control de estos hongos, pero algunos han resultado ser tóxicos para el ser humano. Mientras que la filoxera, un parásito que casi acaba con la viticultura Europea, se da principalmente en el suelo pesado. Hasta el momento, el mejor tratamiento contra la filoxera son los portainjertos resistentes a este parásito (Creasy y Creasy, 2018; Heinitz *et al.*, 2019). Por lo que, el control de las plagas y enfermedades no solo son importantes para el bien del cultivo, sino también por la salud del consumidor.



**Figura 4.** Factores bióticos y abióticos que afectan el crecimiento de vid. (Creado con BioRender.com)

Un factor abiótico importante que limita el crecimiento de la vid son las sequías. Sin un suministro de agua adecuado, los estomas no pueden abrirse para que se lleve a cabo la fotosíntesis. Por lo que, no habrá una buena maduración del fruto (Griesser *et al.*, 2015). Debido a esto, los viticultores se encargan del riego de los cultivos cuando es temporada baja de lluvias. Sin embargo, no debe exceder el riego, ya que resultaría en una disminución en la calidad de la uva. De manera que, cuando hay un sobre riego, se requieren más manejos para salvar la planta, como: un aclareo de brotes y eliminar las hojas, entre otros (Creasy y Creasy, 2018). Por ende, un manejo adecuado de la cantidad de agua proporcionada a los cultivos de la vid es necesario para mantener la calidad del fruto.

Por otro lado, la vid requiere cierta cantidad de calor, para que sus enredaderas tengan una producción adecuada de carbohidratos, y para que se generen racimos de uva que cumplan con los parámetros necesarios (Creasy y Creasy, 2018). Sin embargo, el estrés por calor puede reducir significativamente el rendimiento y calidad de la uva. Esto debido a una disminución en la fotosíntesis a temperaturas superiores a 35 °C (Liu *et al.*, 2012). Además, el estrés por frío también es un factor que disminuye la producción, y lleva a una pérdida económica para los agricultores de la uva. Debido a que, una disminución rápida de la temperatura causa alteraciones serias en los

brotos, tejidos de la raíz y en el tronco, lo que podría provocar una pérdida total de la planta (Fennell, 2004). Por lo tanto, la temperatura es uno de los principales factores abióticos que limita el crecimiento y producción de la vid.

## 2.2. Conservación Actual del Germoplasma de Vid

Debido a que la vid está en constante riesgo por los factores bióticos y abióticos, es importante la conservación de su germoplasma. Para esto, existen los métodos *in-situ* y *ex-situ* (García-Águila *et al.*, 2007; Priyanka *et al.*, 2021). Los métodos *in-situ*, son aquellos en los que la planta se conserva en su hábitat natural. Estos métodos incluyen los hábitats naturales, parques nacionales y reservas ecológicas protegidas. Sin embargo, la falta de vigilancia, los altos costos de mantenimiento y el riesgo a la exposición a los factores bióticos y abióticos, provoca que se cuestione la efectividad de estos métodos (Priyanka *et al.*, 2021).

Por otro lado, los métodos *ex-situ* son aquellos en los que el tejido se conserva fuera de su hábitat natural. Existen los bancos de plantas en campo, bancos de semillas, almacenamiento *in vitro* y la crioconservación (García-Águila *et al.*, 2007). Las desventajas los bancos de plantas en campo se debe a que la planta sigue estando expuesta a los factores bióticos y abióticos y los costos de mantenimiento son altos (Dulloo *et al.*, 2009; Priyanka *et al.*, 2021). Además, los bancos de semillas no son aptos para la conservación de la vid, ya que las semillas que llega a producir este cultivar son recalcitrantes. Las semillas recalcitrantes no son capaces de sobrevivir las bajas temperaturas y la disminución de humedad. Esto debido a que, pierden su viabilidad cuando la humedad disminuye debajo del 30 al 50% (Vázquez-Yanes y Toledo, 1989; Priyanka *et al.*, 2021). A diferencia de las semillas ortodoxas, las cuales son capaces de tolerar las bajas temperaturas y deshidratación, que son las condiciones en que se almacenan las semillas en los bancos de semillas (Merritt y Dixon, 2011). En cuanto al cultivo *in vitro*, el tejido vegetal solo se puede conservar de corto a mediano plazo, debido a que constantemente se tiene que cambiar de medio de cultivo y el tejido sufre el riesgo de ser contaminado por algún microorganismo (Priyanka *et al.*, 2021). Además, conforme pasa el tiempo el cultivo *in vitro* induce variación somaclonal en las plantas (Kaepler *et al.*, 2000). Es por esto que la crioconservación ha cobrado relevancia, debido a que es

un método costo-efectivo y tiene el potencial para conservar el tejido a largo plazo, a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  con nitrógeno líquido, donde se detiene toda actividad metabólica y división celular (González-Arno *et al.*, 2014).

### **2.2.1. Crioconservación de Tejidos Vegetales**

La crioconservación de tejidos vegetales ha sido ampliamente estudiada donde se evalúa el costo, efectividad y optimización de protocolos de crioconservación para diversas especies vegetales. Dulloo *et al.* (2009), analizaron el costo del mantenimiento de un banco de plantas de café en campo y una colección de semillas de café crioconservadas. Sus resultados indican que la crioconservación mostró ser un método costo-efectivo en comparación con los bancos de plantas en campo, y su costo disminuye conforme más semillas/tejidos se almacenen por crioconservación. Se han generado diversos métodos donde se han obtenido porcentajes de viabilidad altos al final de la crioconservación de tejidos vegetales (Souza *et al.*, 2016; Normah *et al.*, 2019), como la encapsulación-vitrificación, encapsulación-deshidratación, vitrificación, encapsulación-vitrificación, desecación, precrecimiento, precrecimiento-desecación y técnica de la microgota (García-Águila *et al.*, 2007; Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, existen algunos procedimientos dentro del protocolo de crioconservación que pueden provocar algunas alteraciones (Kaity *et al.*, 2008; Normah *et al.*, 2019).

### **2.2.2. Etapas de la Crioconservación que Provocan Alteraciones al Tejido**

Desafortunadamente, la crioconservación de los tejidos de las plantas es complicada, ya que la viabilidad puede ser baja, causando que la planta no sea viable después del recalentamiento (Zakaria *et al.*, 2020). Para contrarrestar esto, se ha implementado el uso de soluciones crioprotectoras, deshidratación, diferente velocidad de enfriamiento y pretratamiento de los tejidos. Cada planta tiene diferentes propiedades y necesidades al momento de ser manipulada. En caso de

no tomar en cuenta los requerimientos de cada planta, el tejido crioconservado estaría expuesto a sufrir cambios bioquímicos, fisiológicos y moleculares (Kaity *et al.*, 2008; Nausch y Buyel, 2021). Debido a esto, se requiere una optimización del protocolo que sea utilizado, y que se adapte a los diferentes tipos de tejido de cada planta.

2.2.2.1. Enfriamiento y recalentamiento del tejido. Durante el enfriamiento del tejido en la crioconservación, se debe evitar la formación de cristales de hielo. Se ha observado que la velocidad de enfriamiento afecta la ósmosis, difusión y formación de cristales de hielo dentro de la célula (Christensen y Tiersch, 2005). De igual manera, la temperatura y duración del recalentamiento es de relevancia, ya que se ha observado variabilidad genética en dicho paso en yemas axilares crioconservadas de vid (Lazo-Javalera *et al.*, 2016). Además, una velocidad rápida de enfriamiento evita la formación de cristales de hielo y modificaciones celulares (Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, una velocidad lenta de enfriamiento es mejor para células en suspensión (Kaczmarczyk *et al.*, 2012). Esto debido a que, se requiere deshidratar el tejido previamente, lo cual lleva sus propias implicaciones, y esto se dificulta en tejidos con una estructura más compleja (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014). Principalmente, se ha sugerido que el recalentamiento después del enfriamiento, debe ser rápido, donde se coloca el tejido en un baño de agua entre 38 y 40 °C o en la solución de descarga a temperatura ambiente. Esto para evitar la recristalización del hielo, ya que puede ocurrir la nucleación del hielo si el recalentamiento es lento. Además, el uso de una solución de descarga (conteniendo osmo-crioprotectores), después del recalentamiento, ayuda a disminuir el riesgo de que el tejido sufra algún estrés osmótico al pasarlo de la solución de vitrificación al medio de regeneración después de la crioconservación (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014; Nausch y Buyel, 2021). Por lo tanto, el mejoramiento de las condiciones de enfriamiento y recalentamiento en la crioconservación del tejido de la vid es indispensable, para aumentar la viabilidad del tejido.

2.2.2.2. Pretratamiento y deshidratación del tejido. La utilización de pretratamientos como la aclimatación al frío, inmersión en soluciones concentradas de azúcar y la deshidratación han mejorado la supervivencia de los tejidos sometidos a la crioconservación (Kaczmarczyk *et al.*,

2012). La aclimatación al frío consiste en exponer el tejido a diferentes temperaturas bajas por un tiempo previo a la crioconservación. Esto permite que aumente la tolerancia del tejido al frío y sufra menores alteraciones durante el enfriamiento, por la activación de genes que codifican para enzimas antioxidantes, lo cual le brinda estabilidad a la membrana celular a bajas temperaturas (Baek y Skinner, 2003; Kaczmarczyk *et al.*, 2012). Mientras que, la inmersión en soluciones concentradas en azúcar reducen las modificaciones en la membrana celular. Esto se logra gracias a que las moléculas de azúcar permiten deshidratación celular y un equilibrio en la membrana (Zhu *et al.*, 2006; Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

Posterior a estos tratamientos, generalmente se realiza una deshidratación celular para lograr la supervivencia del tejido. La deshidratación previene la formación de cristales de hielo al reducir la cantidad de agua residual en la célula. Esto se logra al aumentar la osmolaridad del medio y deshidratar la célula, mediante el uso de una campana de flujo laminar o matrices de sílice previo al enfriamiento. De tal manera que, la deshidratación reduce el uso de soluciones que potencialmente pueden ser tóxicas y promueve el crecimiento del tejido posterior a la crioconservación (Nausch y Buyel, 2021). Desafortunadamente, se ha observado que este paso provoca un aumento de la concentración del soluto, interrupción en el intercambio iónico y alteraciones en las interacciones moleculares, lo que lleva a daño celular (Kaczmarczyk *et al.*, 2012). En este sentido, Ren *et al.* (2015) reportaron un aumento en la producción de peróxido de hidrogeno y malondialdehído, los cuales son Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) que causan muerte celular, durante la deshidratación de plántulas de *Arabidopsis*. Sin embargo, cuando se optimizó la etapa de la deshidratación del tejido la producción de EROs disminuyeron. Es por esto que, se requieren futuros estudios para optimizar la deshidratación celular y mejorar la calidad del tejido crioconservado.

2.2.2.3. Compuestos tóxicos de las soluciones de vitrificación. Las soluciones de vitrificación se encargan de mantener un estado vítreo en el citoplasma para evitar la formación de hielo intra y extracelular (Lazo-Javalera *et al.*, 2017). Dichas soluciones están compuestas de diversas sustancias que pueden traspasar la pared celular, no traspasan la pared celular o traspasan tanto la pared celular y membrana celular. Los compuestos que son capaces de penetrar la pared celular son: oligosacáridos, manitol, aminoácidos y polímeros de bajo peso molecular. Mientras que, los

compuestos que no son capaces de penetrar la pared celular son: polímeros de alto peso molecular, polisacáridos y proteínas. Mientras que, el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) son capaces de penetrar la pared y membrana celular. Es posible que los compuestos penetrantes provoquen plasmólisis temporal debido a que interaccionan con las moléculas de agua, disminuyendo la adhesión entre la pared y membrana celular (Benson, 2008).

Durante de la crioconservación de tejido vegetal comúnmente se utiliza la solución de vitrificación vegetal 2 (PVS2) ó 3 (PVS3), propuestas por Sakai *et al.* (1990) y Nishizawa *et al.* (1993), respectivamente, para mejorar la preservación del tejido en el proceso de vitrificación. La PVS2 está compuesta por: glicerol 30% (p/v), etilen-glicol 15% (p/v), DMSO 15% (p/v) y sacarosa 0.4 M disueltos en medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), y ha sido descrita como una solución crioprotectora eficiente y es la solución de vitrificación más utilizada (Sakai *et al.*, 1990; Normah *et al.*, 2019). Mientras que, la PVS3 conteniendo: glicerol 50% (p/v) y sacarosa 50% (p/v) disueltos en medio MS, y es la segunda solución de vitrificación de elección (Nishizawa *et al.*, 1993; Normah *et al.*, 2019). Estas soluciones interactúan con las moléculas de agua mediante fuerzas dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno, para disminuir la cantidad de moléculas de agua libres (Nausch y Buyel, 2021). Jeyanthi *et al.* (2011) utilizaron el PVS2 para la crioconservación de *Dendrobium Bobby Messina*, y obtuvieron homogeneidad celular y buena viabilidad. Por lo que, su uso permite evitar modificaciones celulares y una buena preservación del tejido.

Desafortunadamente, Raju *et al.* (2021) mencionan que el glicerol y el DMSO, dos crioprotectores penetrantes del PVS2, pueden ser tóxicos y causar modificaciones en algunos tejidos. Además, los consideran inadecuados e ineficientes para múltiples tipos de células, debido a que se requieren lavados excesivos del tejido para eliminar el residuo de estas sustancias previo al recalentamiento. Esto implica una pérdida económica y de tiempo en el proceso de la crioconservación. También, se ha observado que la penetración que tiene la solución de vitrificación dentro del tejido es directamente proporcional al tiempo de exposición de dicha solución. En algunos casos, una buena penetración de la solución de vitrificación ayuda a evitar alteraciones celulares. Sin embargo, cuando hay una sobreexposición a estas soluciones es posible que el tejido sufra modificaciones celulares por la pérdida excesiva de agua y estrés osmótico, ya que las soluciones de vitrificación deshidratan el tejido (Kaczmarczyk *et al.*, 2012; Sakai y Engelmann, 2007). Es por esto, que establecer los tiempos de exposición correctos a la solución de crioconservación puede evitar posibles alteraciones celulares.

### 2.3. Alteraciones Ocasionadas por la Crioconservación en Plantas

La crioconservación ha sido descrita como una técnica eficaz para la preservación de tejidos de diversas plantas, incluyendo la vid (Gonzalez-Arno *et al.*, 2014; Nausch y Buyel, 2021; Wang *et al.*, 2004; Wilkinson *et al.*, 2003). Sin embargo, existen múltiples estudios donde se demuestra que puede ocasionar alteraciones moleculares, bioquímicas y fisiológicas (**Cuadro 1**) (Ganino *et al.*, 2012; García-Coronado *et al.*, 2016; Lazo-Javalera *et al.*, 2015; Martínez-Montero *et al.*, 2002). Además, la crioconservación de la variedad Red Globe de la vid es de importancia. Esto debido al gran contenido de flavonoides, fenoles y minerales en sus semillas, que son de gran fundamental para la industria farmacéutica y cosmética, además de los posibles efectos positivos en la salud (Özcan *et al.*, 2017). Por lo que, existe controversia sobre la eficiencia de la crioconservación y justo da origen a la pregunta, ¿qué efectos citotóxicos causa la crioconservación sobre embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe?

**Cuadro 1.** Alteraciones ocasionadas por la crioconservación en tejidos vegetales.

<b>Alteración relacionada con crioconservación</b>	<b>Tejido vegetal</b>	<b>Referencia</b>
Fuga de electrolitos, peroxidación de lípidos y un incremento de proteínas de membrana	Callos embriogénicos de caña de azúcar ( <i>Saccharum sp.</i> )	(Martínez-Montero <i>et al.</i> , 2002)
Plasmólisis por la vitrificación	Puntas de brote de porta injerto de Kober 5 BB (cruce entre <i>Vitis berlandieri</i> y <i>Vitis riparia</i> )	(Ganino <i>et al.</i> , 2012)
Variabilidad genética posterior al recalentamiento	Yemas axiliares de vid ( <i>V. vinifera</i> L.) cv. Flame Seedless	(Lazo-Javalera <i>et al.</i> , 2016)
Aumento de malondialdehído por la deshidratación	Yemas axiliares de vid cv. Flame Seedless	(Lazo-Javalera <i>et al.</i> , 2015)
Alteración en los niveles de metilación del ADN por la vitrificación	Embriones cigóticos de la vid cv. Red Globe	(García-Coronado <i>et al.</i> , 2016)

### 2.3.1. Alteraciones Bioquímicas

Cuando existe la formación de EROs por un proceso de estrés oxidativo, actúan enzimas que estabilizan a las EROs para protegerla contra las alteraciones. Algunas de estas enzimas son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX) (Elavarthi y Martin, 2010). Además, las EROs producen una peroxidación lipídica cuando atacan a los ácidos grasos de la membrana celular. Esto provoca una acumulación de malondialdehído (MDA), el cual es el producto final de la peroxidación lipídica (Parkhey *et al.*, 2012). Por lo que, un aumento de estas enzimas indica la generación de alguna alteración por la presencia de EROs.

Rahmah *et al.*, (2015), trabajaron con tejido de *Brassidium*, un género de orquídeas híbrido, reportaron un aumento de la actividad de APX y CAT en los procesos de deshidratación y vitrificación. Además, se observaron cambios en la estructura celular mediante microscopía electrónica durante la exposición a nitrógeno líquido. Esto indica que la deshidratación y vitrificación provocan un estrés oxidativo limitando la viabilidad y calidad del tejido. Por otro lado, Lazo-Javalera *et al.* (2015), observaron una disminución en la actividad de SOD y CAT, y un aumento en las concentraciones de MDA en el proceso de vitrificación de yemas axilares de la vid del cultivar Flame Seedless. Esto se debe a una respuesta enzimática hacia el estrés oxidativo causado por la vitrificación. Por esta razón, se requieren futuros estudios que evalúen la actividad antioxidante en embriones cigóticos de la variedad Red Globe de vid. Lo anterior, para poder confirmar que algunos procesos de la crioconservación pueden provocar alteraciones bioquímicas por la formación de EROs.

### 2.3.2. Cambios Moleculares

Wilkinson *et al.* (2003) mencionan que la crioconservación es una técnica adecuada para la preservación de tejido de *Cosmos atosanguineus* a largo plazo. Además, indican que no se observó variabilidad genética en el tejido regenerado después de 12 meses de ser almacenado en nitrógeno líquido. Sin embargo, también mencionan que la calidad del tejido regenerado no fue el adecuado. Kulus *et al.* (2019), realizaron un estudio donde evaluaron los efectos que tiene la crioconservación

sobre plantas mutantes de algunas variedades de la flor *Chrysanthemum*. Este estudio demostró que la crioconservación protege la estructura de cada quimera, pero afecta el crecimiento de la planta. De tal manera que, estos dos estudios demuestran que la crioconservación brinda estabilidad molecular, pero se obtiene un tejido de baja calidad al ser regenerado.

A diferencia de los dos estudios anteriores, Kaity *et al.* (2008) reportan cambios genéticos y epigenéticos en tejidos crioconservados de papaya. Así mismo, Lazo-Javalera *et al.* (2016) demuestra en su estudio que la crioconservación causó cambios en la variabilidad genética, específicamente durante el enfriamiento y recalentamiento en yemas axilares de la vid. Además, García-Coronado *et al.* (2016) sugieren que la crioconservación y vitrificación generan alteraciones en la metilación de ADN y en la regulación de expresión de genes en embriones cigóticos de *V. vinifera* cv. Red Globe. Lo anterior, posiblemente es la causa de que el embrión tenga un bajo desarrollo posterior a la crioconservación.

Por otro lado, la pared celular es una capa resistente y rígida, y, como se describe más adelante, está compuesta de celulosa, una matriz de polisacáridos y proteínas estructurales (Carpita y Gibeaut, 1993). Las expansinas, son proteínas estructurales de la pared celular que inducen y regulan la expansión celular de forma dependiente del pH. Estas proteínas calibran el crecimiento inducido por la acidez al reducir los enlaces no covalentes que mantienen las microfibras de celulosa en su lugar en la pared celular (Cosgrove, 2005). Existen dos familias de expansinas capaces de expandir la pared celular, las  $\alpha$  y  $\beta$ -expansinas, siendo las  $\alpha$ -expansinas las más abundantes (Cosgrove *et al.*, 2002; Cosgrove, 2005; Liu *et al.*, 2019). También, existen las expansinas como proteínas A y B, que también se encuentran en bacterias y hongos, y podrían ayudar a estos microorganismos a penetrar el tejido vegetal (Cosgrove *et al.*, 2002; Cosgrove, 2005). Se ha visto que las  $\alpha$ -expansinas están relacionadas con el estrés por frío. Esto debido a que se ha visto que los genes que codifican para expansinas son inducidos cuando el tejido es expuesto a temperaturas bajas (Zhang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Además, Feng *et al.* (2019) reportaron que la sobreexpresión de una  $\beta$ -expansina de *Arabidopsis thaliana*, no solo aumentaba el contenido de celulosa y lignina, si no aumentaba la tolerancia al estrés por frío al mejorar la regulación osmótica y antioxidante.

Quijada-Rivera (2021), observaron en el análisis transcriptómico en embriones cigóticos de la vid cv. Red Globe posterior a la crioconservación, que el gen de la expansina- $\alpha$ 1 (EXPA1) fue reprimido de manera significativa. Lo cual es de interés, ya que se ha reportado anteriormente que los genes de las expansinas son inducidos debido al estrés por frío, lo cual es contrario a lo

reportado por Quijada-Rivera (2021). Aún falta explicar a profundidad el modelo de regulación de las expansinas (Liu *et al.*, 2019), lo cual ayudará a elucidar la dinámica de la expresión del gen EXPA1 a lo largo de todo el proceso de la crioconservación. Por lo tanto, se requieren más estudios para confirmar estos cambios moleculares en los tejidos crioconservados de vid.

### **2.3.3. Modificaciones Celulares**

La integridad celular de las plantas es de gran importancia, ya que la pared celular brinda estructura e integridad mecánica a la célula y juega un papel en el crecimiento y diferenciación de tejidos (Herrera-Ugbaldo y de Folter 2018). La pared celular está compuesta de una lámina media, *middle lamella* en latín, pared primaria y secundaria (Cosgrove, 2005). La lamela media es una capa adhesiva que mantiene unidas a las células. Esta capa está formada principalmente por pectinas, uno de los polisacáridos más complejos, y son determinantes para el grosor de la pared celular y el tamaño de los poros (Carpita y Gibeaut, 1993; Cosgrove, 2005).

La pared celular primaria está compuesta por celulosa y de una matriz compleja de polisacáridos, como hemicelulosa y pectinas. La celulosa es el polímero más abundante y útil en el planeta, y es sintetizada por complejos grandes de membrana (Cosgrove, 2005). La celulosa cristalina inicialmente se orienta de manera aleatoria en las células meristemáticas, pero luego las fibras se alinean de manera paralela perpendicularmente hacia el eje de elongación (Voiniciuc *et al.*, 2018). Por otro lado, la hemicelulosa se une a la celulosa, pero se ramifica y otras modificaciones en su estructura impiden que forme microfibras por sí sola. Los xiloglucanos y arabinoxilanos son los dos tipos de hemicelulosas más abundantes. Las pectinas un grupo complejo de polisacáridos, y también se encuentran en la pared celular primaria (Cosgrove, 2005). Estos polisacáridos son sintetizados por el aparato de Golgi, igual que las hemicelulosas (Voiniciuc *et al.*, 2018). La pared celular secundaria se genera después de que la célula termina de desarrollarse, pero esta estructura no está presente en todas las células. Generalmente, está presente en células que requieren de una gran resistencia mecánica y refuerzo estructural (Cosgrove, 2005).

Además, de contener celulosa y la matriz de polisacáridos, la pared celular también está compuesta de proteínas estructurales. Como las proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina, arabinogalactanas y las proteínas ricas en hidroxiprolina, también conocidas como extensinas

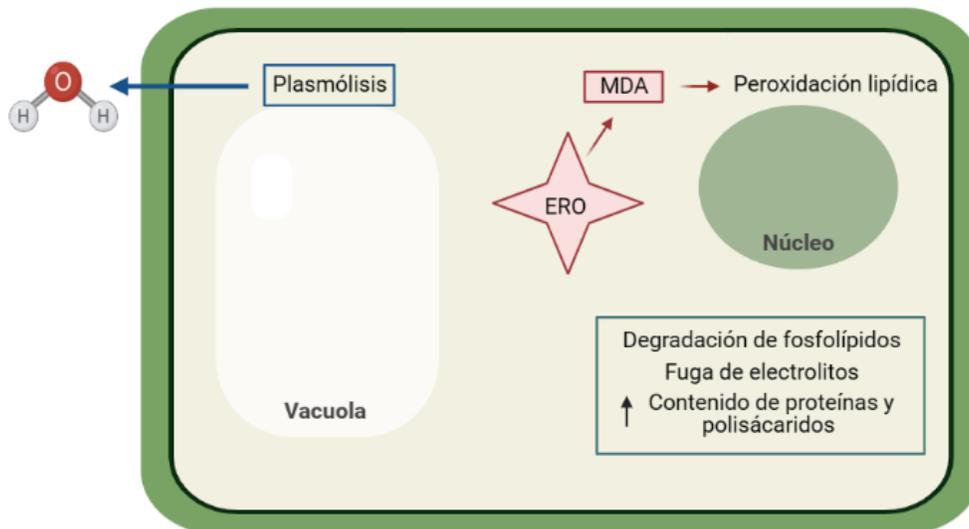
(Carpita y Gibeaut, 1993). Estas proteínas juegan un papel importante en la elongación de la pared celular (Cosgrove *et al.*, 2002). Como se mencionó anteriormente, algunos de los genes que codifican para estas proteínas se han visto inducidos por el estrés por frío y reprimidos al final de la criopreservación de tejido vegetal (Zhang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Quijada-Rivera, 2021). La membrana celular ó membrana plasmática es otro componente celular importante, ya que se encarga de la protección celular y del transporte de nutrientes (Leonard y Hodges, 1980). Está compuesta principalmente por proteínas y lípidos, que generaran una distribución de un modelo mosaico fluido. Los lípidos de la membrana celular desarrollan un papel importante en la estructura de los componentes celulares que regulan la fluidez de la membrana y la transducción de señales. La bicapa lipídica está involucrada en la fluidez de la membrana, ya que sus componentes están unidos por interacciones no covalentes. Por lo que, la posición tipo y cantidad de los lípidos y proteínas puede cambiar (Furt *et al.*, 2011). El transporte de nutrientes y moléculas a través de la membrana puede ser pasivo y activo. En el transporte pasivo no se requiere de energía, y puede ser a través de la difusión simple o facilitada. En la difusión facilitada, las moléculas atraviesan la membrana con la ayuda de poros o proteínas acarreadoras (Leonard y Hodges, 1980). En el transporte activo se requiere de energía, ya que las moléculas viajan en contra del gradiente. La bomba de protones, H<sup>+</sup>-ATPasa, es una de las principales proteínas de la membrana que se encarga del transporte de iones y metabolitos a través de la membrana, ya que genera una fuerza motriz de protones que permite el paso de estas moléculas (Morsomme y Boutry, 2000). Por lo que, los componentes de la pared y membrana celular juegan un papel importante en mantener la estabilidad e integridad de la célula.

Se ha observado, que la exposición a bajas temperaturas provoca cambios en el metabolismo de los lípidos de la membrana celular (Wang *et al.*, 2019) y degradación de los polisacáridos de la pared celular en algunas plantas (Fan *et al.*, 2019). Un estudio realizado por Martínez-Montero *et al.* (2002), indicó que hay fuga de electrolitos, peroxidación lipídica y disminución de proteínas de membrana por el enfriamiento en la criopreservación de callos embriogénicos de caña de azúcar. Lo anterior, demuestra, las alteraciones que puede generar el enfriamiento durante la criopreservación a la integridad celular.

Zakaria *et al.* (2020), reportaron que el proceso de deshidratación provoca plasmólisis en orquídeas criopreservadas. La plasmólisis es un proceso donde se disminuye el potencial osmótico de la célula, donde la pared y membrana celular se separan, causando malformaciones celulares. Además, en el mismo estudio se observó una ruptura de las células posterior al enfriamiento, lo

cual disminuyó la viabilidad del tejido. La investigación de Ganino *et al.* (2012) mostró resultados similares, ya que también se observó plasmólisis. Sin embargo, la alteración se observó en el proceso de vitrificación en puntas de brote del porta injerto Kober 5 BB, el cual es un híbrido entre *Vitis berlandieri* y *Vitis riparia*.

En el estudio de Ganino *et al.* (2012) se utilizó la PVS2, la cual contiene DMSO y glicerol. Como se mencionó anteriormente, estas dos sustancias pueden ser tóxicas para el tejido y causar modificaciones. Debido a que se utilizó un género igual que la vid en este estudio, existe la posibilidad que el proceso de vitrificación provoque la misma alteración en la variedad Red Globe de la vid. Además, considerando los hallazgos de los otros estudios, la crioconservación podría provocar deshidratación celular y lesiones por la exposición a NL en la membrana celular de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe (**Figura 5**). De tal manera que, se podría observar la formación de especies reactivas de oxígeno, fuga de electrolitos, degradación de fosfolípidos, plasmólisis y disminución del contenido de proteínas y polisacáridos de la membrana celular. De ahí que, es necesario realizar estudios histológicos a embriones cigóticos de vid del cultivar Red Globe, ya que no existen reportes dónde se describan las modificaciones que puede provocar la crioconservación a la integridad celular de vid.



**Figura 5.** Posibles modificaciones celulares que podrían provocar algunos pasos en el proceso de la crioconservación. ERO: especies reactivas de oxígeno. MDA: malondialdehído. (Creado con BioRender.com)

Los diversos efectos negativos que se han descrito por la crioconservación en tejidos de la vid y otras plantas tienen cierta relación. Como se mencionó previamente, Lazo-Javalera *et al.* (2015; 2016) observaron un aumento de MDA y cambios en la variabilidad genética durante el recalentamiento en yemas axilares de la vid cultivar Flame Seedless. Mientras que, Rahmah *et al.* (2015) reportaron un aumento de las enzimas APX y CAT, y cambios estructurales por el estrés osmótico causado por la deshidratación en tejido de orquídeas. Los demás estudios antes mencionados solo se enfocaron en identificar un tipo de modificación, ya sea que fuera fisiológico, bioquímico o molecular. Lo cual, no excluye la posibilidad de que esté presente otro tipo de alteración que sea causada por la crioconservación. Por lo anterior, es imperativo realizar estudios enzimáticos, histológicos y moleculares sobre los efectos que tiene la crioconservación en el tejido de la vid y otras plantas.

#### 2.4. Análisis Histológicos para la Identificación de Cambios Celulares Relacionados con Crioconservación

##### 2.4.1. Estudios Histológicos en Tejidos Vegetales Crioconservados

Existen múltiples estudios donde han utilizado diversas tinciones en cortes histológicos para la identificación de cambios celulares ocasionados por la crioconservación u otros procesos (**Cuadro 2**). Suzuki *et al.* (1998) fue el primer estudio reportado en este tópico, donde el análisis histológico reveló que solo algunas células ubicadas en el primordio foliar y en el meristemo apical de segmentos nodales de *Asparagus officinalis* L., lograron sobrevivir el protocolo de crioconservación implementado. Además, existe la posibilidad que haya ocurrido una desorganización y/o cambios fisiológicos en las células supervivientes de los segmentos nodales crioconservados, responsables de la formación de raíces, como consecuencia de la crioconservación. Similarmente, en el estudio realizado por Lambardi *et al.* (2000), donde se analizó mediante histología los cambios presentes en puntas de brote crioconservadas de *Populus alba* L., se reportó que las células ubicadas en el meristemo apical no sufrieron alguna alteración.

Sin embargo, las células ubicadas en las hojas axilares jóvenes presentaron rupturas, pero esto afectó poco la regeneración del tejido. Esto muestra que la ubicación de las células dentro del tejido tiene relevancia en cuando a la viabilidad que van a tener posterior a la crioconservación.

**Cuadro 2.** Hallazgos histológicos en tejidos vegetales crioconservados.

Especie	Tejido	Colorante (tinción)	Hallazgos Histológicos	Referencia
<i>Asparagus officinalis</i> L. cv. Mary Washington 500W	Segmentos nodales (Tamaño: 5 mm)	Paragon Multiple Stain	Supervivencia de células ubicadas en el primordio foliar y en el meristema apical de segmentos nodales. Posible desorganización y/o cambios fisiológicos de células responsables de la formación de raíces.	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
<i>Populus alba</i> L.	Puntas de brote (Tamaño 1-2 mm)	PAS + anilina azul negro	Las hojas axilares jóvenes sufrieron alteraciones como rupturas, mientras que las células en el meristemo apical estuvieron libres de cambios.	Lambardi <i>et al.</i> , 2000
<i>Citrus clementina</i>	Embriones somáticos (Tamaño: 0.4-0.5 mm)	PAS	La encapsulación-deshidratación aumento la presencia de polisacáridos, lo cual aumento la viabilidad del tejido.	González-Arno <i>et al.</i> , 2003
<i>Dendrobium</i> Bobby Messina	PLBs (Tamaño: 3-4 mm)	Safranina + verde rápido	El protocolo de crioconservación provoco ruptura de la pared celular, núcleos más voluminosos, citoplasmas más densos y células más homogéneas entre sí. Lo cual ocasionó la presencia de plasmólisis, encogimiento del núcleo y ruptura de la pared y membrana celular.	Jeyanthi <i>et al.</i> , 2011
<i>Dioscorea alata</i>	Puntas de brote (Tamaño: 1-2 mm)	PAS + anilina azul negro	Los procesos de osmoprotección, deshidratación y la crioconservación del tejido provoca plasmólisis, disminución de la relación núcleo-citoplasma y aumento del contenido de proteínas. En el tejido crioconservado que fue regenerado, las células ubicadas en el meristemo obtuvieron sus características originales con algunos gránulos de almidón.	Barraco <i>et al.</i> , 2014

**Cuadro 2.** Hallazgos histológicos en tejidos vegetales crioconservados (continuación).

<b>Especie</b>	<b>Tejido</b>	<b>Colorante (tinción)</b>	<b>Hallazgos Histológicos</b>	<b>Referencia</b>
<i>Brassidium</i> Shooting Star	PLBs (Tamaño: 1-4 mm)	Safranina + verde rápido	Aumentar la concentración de sacarosa y no utilizar una solución de descarga aumenta el grado de contracción y modificaciones celulares. Utilizar PVS3 por largos periodos de tiempo provoca plasmólisis, pero la alteración es más severa al no utilizar la solución. La crioconservación y precultivo mayor a 24 h provoca alteraciones celulares y síntomas de plasmólisis.	Mubbarakh <i>et al.</i> , 2014
<i>Malus domestica</i> (Borkh.)	Puntas de brote (Tamaño: 2-3 mm)	Azul de toluidina (0.1%)	Las células ubicadas en el domo apical tienen mayor capacidad de sobrevivir posterior a la exposición a NL, en comparación con las células en los primordios foliares.	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Citrus limon</i> ‘Eureka lemon’	Puntas de brote (Tamaño: 3-5 mm)	Stevenel's Blue	Pocos cambios celulares visibles. Solo algunas células de mayor tamaño ubicadas en las regiones bajas del tejido presentaron plasmólisis.	Volk <i>et al.</i> , 2017
<i>Passiflora pohlii</i> Mast.	Puntas de raíz (Tamaño: 1 cm)	PAS + anilina azul negro	El uso de PVS2 y PVS3 provocó plasmólisis, pero disminuyó significativamente 7 días después del recalentamiento. No se observó la presencia de plasmólisis 30 días después del recalentamiento.	Simão <i>et al.</i> , 2018
<i>Vitis vinifera</i> cv. Riesling	Puntas de brote (Tamaño: 1 mm)	Azul de metileno	PVS2 provocó plasmólisis sobre las células de la corteza vacuolar, pero la exposición a PVS2 y NL causó disrupción de la membrana celular. Las células del meristema apical y lateral no sufrieron algún cambio por el uso de PVS2 ó NL.	Bettoni <i>et al.</i> , 2019
<i>Tarenaya rosea</i>	Raíz (Tamaño: 0.3-0.4 cm)	PAS + anilina azul negro Sudan IV Rutenio rojo Lugol Cloruro férico	El espacio intercelular aumentó durante la crioconservación. El uso de la solución de carga y PVS3 provocaron plasmólisis. Mientras que la solución de descarga disminuyó el grado de plasmólisis. Se observó la presencia de polisacáridos, proteínas, lípidos y pectinas en el espacio intercelular.	Da Silva Cordeiro <i>et al.</i> , 2020
<i>Oncidium</i> Golden Anniversary	PLBs	PAS + anilina azul negro	La osmoprotección y deshidratación del tejido provocó plasmólisis, y la exposición a NL y el recalentamiento causaron ruptura y colapso de las células meristemáticas.	Zakaria <i>et al.</i> , 2020

**PLBs:** Cuerpos similares a protocormos. **PVS2:** Solución de vitrificación vegetal 2. **PVS3:** Solución de vitrificación vegetal 3. **NL:** Nitrógeno líquido. **PAS:** Ácido periódico de Schiff.

González-Arno *et al.* (2003), mostraron que la viabilidad de embriones somáticos de cítricos criopreservados aumentaba gracias a la acumulación de polisacáridos, siendo un efecto secundario causado por la encapsulación-deshidratación del tejido. Esto es ocasionado por la acumulación de sacarosa durante la encapsulación-deshidratación, lo cual permite que el tejido soporte el enfriamiento y deshidratación a lo largo del protocolo de criopreservación. Por otro lado, Jeyanthi *et al.* (2011), analizaron histológicamente PLBs de *Dendrobium Bobby Messina* criopreservados. Este estudio reveló que las células criopreservadas sufrieron ruptura de la pared celular, núcleos más voluminosos y citoplasmas más densos. Esto viene siendo indicativo de la presencia de plasmólisis, encogimiento del núcleo y ruptura de la pared y membrana celular, como consecuencia del protocolo de criopreservación utilizado.

Barraco *et al.* (2014), en su estudio histológico en puntas de brote de *Dioscorea alata* criopreservadas mediante encapsulación-deshidratación, reportaron algunas alteraciones que ocasionan ciertos procesos de su protocolo de criopreservación. Primeramente, observaron la presencia de plasmólisis en las células de los controles del precultivo, osmoprotección y deshidratación, pero el grado de plasmólisis fue significativamente mayor en los últimos dos procesos. En el tejido criopreservado el grado de plasmólisis fue similar al del control de osmoprotección y deshidratación. Además, la relación núcleo-citoplasma disminuyó y el contenido de proteínas aumentó debido los procesos de osmoprotección, deshidratación y exposición a NL. A pesar de las modificaciones presentes al tejido criopreservado, se logró observar en el tejido colocado en medio de regeneración por 30 días posterior a la criopreservación, fue capaz de regenerarse donde las células ubicadas en el meristema obtuvieron sus características originales.

Mubbarakh *et al.* (2014), analizaron los efectos de la criopreservación en PLBs de *Brassidium* Shooting Star utilizando PVS3 como crioprotector. Su estudio demostró, que el uso de una solución de sacarosa con una concentración mayor a 0.25 M y ausencia del uso de la solución de descarga, provoca contracción celular y ruptura de la pared celular. Además, al exponer el tejido a la PVS3 por un largo periodo de tiempo aumentaba el grado de plasmólisis, pero se ocasionaba una plasmólisis más severa al no implementar PVS3 en el protocolo de criopreservación. Las células expuestas al medio de precultivo y criopreservadas por un periodo mayor a 24 h, presentaron cambios celulares y síntomas de plasmólisis, como contracción nuclear, ruptura de la pared celular, citoplasmas teñidos ligeramente y ausencia de núcleos.

Li *et al.* (2015), Suzuki *et al.* (1998) y Lambardi *et al.* (2000), mostraron que las células ubicadas

en el domo apical tienen mayor capacidad de sobrevivir a la exposición a NL, en comparación con las células ubicadas en los primordios foliares. Contrario a los hallazgos de estos autores, Volk *et al.* (2017) observaron muy pocos cambios en las células de puntas de brote de *Citrus limon* 'Eureka lemon' expuestas a NL; si existían algunas células de mayor tamaño que presentaban plasmólisis, ubicadas en las regiones bajas del tejido, pero esto sigue siendo una diferencia a lo reportado en otros estudios. Volk y colaboradores, le adjudican este hallazgo a que las puntas de brote que no sufrieron algún cambio, ya que le brindaron los nutrientes necesarios desde el microinjerto al meristema en crecimiento.

Simão *et al.* (2018), realizaron un análisis histológico en puntas de raíz de *Passiflora pohlii* Mast. criopreservadas. Determinaron que el uso de los crioprotectores, PVS2 y PVS3, provocaron plasmólisis sobre las células, principalmente a las células corticales. Sin embargo, las células eran capaces de regenerarse. Esto debido a que siete días después del recalentamiento, el grado de plasmólisis había disminuido significativamente, y para el día 30, posterior al calentamiento, la presencia de plasmólisis había desaparecido, con la excepción de las células ubicadas en la epidermis. De manera semejante, Bettoni *et al.* (2019) reportaron que el uso de PVS2 provoca plasmólisis sobre las células de la corteza vacuolar, y ruptura de la membrana celular en células de la corteza expuesta a PVS2 y NL, esto en puntas de brote de *V. vinifera* cv. Riesling. Por otro lado, las células ubicadas en el meristema apical y lateral no sufrieron algún cambio debido al uso de PVS2 ó la exposición a NL. A pesar de las alteraciones observadas en las otras células, las puntas de brote mostraron algún tipo de crecimiento a los 6 días de regeneración.

Da Silva Cordeiro *et al.* (2020), detectaron que el uso de la solución de carga y PVS3 provoca plasmólisis sobre las células de raíz de *Tarenaya rosea*, pero el grado de plasmólisis disminuía al implementar la solución de descarga. Además, durante el protocolo de criopreservación el espacio intercelular fue aumentando, y se detectó la presencia de polisacáridos, proteínas, lípidos y pectinas dentro del espacio intercelular. Por otro lado, Zakaria *et al.* (2020) analizaron los cortes histológicos de PLBs de *Oncidium* Golden Anniversary. Resaltaron que la viabilidad de los PLBs se vio afectada por la presencia de plasmólisis y ruptura celular. Esto viene como consecuencia del uso del medio de osmoprotección y deshidratación, los cuales provocaron un aumento del grado de plasmólisis. También por la exposición a NL y el recalentamiento, ya que causaron ruptura y colapso de las células meristemáticas.

Estos estudios demuestran la relevancia que tiene la exposición del tejido a soluciones de carga,

osmoprotectores, deshidratación, crioprotectores, nitrógeno líquido, recalentamiento, soluciones de descargas, en cuanto al tipo de modificación que pueden provocar. Además, la ubicación de las células en el tejido también es importante. Esto debido a que, se observó en algunos estudios que las células ubicadas en el meristemo apical tenían mayor resistencia contra los cambios causados por la crioconservación en comparación con las células ubicadas en los primordios foliares (Suzuki *et al.*, 1998; Lambardi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2015). Por lo tanto, los hallazgos de estos análisis histológicos permitieron identificar las modificaciones celulares que provocan ciertos pasos de la crioconservación. Esto va a permitir generar un protocolo óptimo de crioconservación para los tejidos y especies de cada estudio mencionado, lo cual es lo que se espera obtener a partir de este trabajo.

#### **2.4.2. Tinciones para el Análisis Histoquímico de Tejidos Vegetales Crioconservados**

Las tinciones para el análisis histoquímico de tejidos vegetales crioconservados serían de utilidad debido a que las células en su pared y membrana celular están compuestas de algunos polisacáridos, y son estructuras que usualmente sufren alteraciones durante la crioconservación (Kaczmarczyk *et al.*, 2012). La pared celular está compuesta de diversos polisacáridos como la celulosa, pectinas hemicelulosa y xiloglucanos. En situaciones de estrés, usualmente estos componentes se disminuyen (Martinez-Montero *et al.*, 2002). Además, durante la crioconservación el tejido es expuesto a diversas soluciones que contienen algunos polisacáridos, como las soluciones crioprotectoras, soluciones de carga y descarga. En este sentido, sería pertinente conocer el comportamiento de la célula y la distribución de sus polisacáridos al estar expuesta a dichas sustancias.

Como se ha mencionado, un componente de la célula que es propenso de sufrir alguna alteración por la crioconservación es la pared celular, usualmente se presenta ruptura de la pared celular. La celulosa es el polisacárido más abundante en la pared celular y le brinda fuerza y resistencia (Carpita y Gibeaut, 1993). Siendo esta la función de la celulosa, es importante analizar la dinámica de este polisacárido durante el proceso de crioconservación. Además, otro cambio que es común que afecte la pared y membrana celular es la plasmólisis, lo cual conduce a la ruptura de la pared

celular (Barraco *et al.*, 2014; Bettoni *et al.*, 2019; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020; Mubbarakh *et al.*, 2014; Simão *et al.*, 2018; Volk *et al.*, 2017; Zakaria *et al.*, 2020).

Se ha utilizado el ácido periódico de Schiff (PAS), para teñir los polisacáridos en los cortes histológicos (Barraco *et al.*, 2014; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020; González-Arno *et al.*, 2003; Lambardi *et al.*, 2000; Simão *et al.*, 2018; Zakaria *et al.*, 2020). El uso de esta tinción permitió visualizar el grado de plasmólisis y aumento de polisacáridos causado por la crioconservación (Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020). Herrera-Ugbaldo y de Folter (2018), realizaron un estudio donde utilizaron azul de toluidina, rojo congo y PAS para analizar la calidad general de la pared celular y la distribución de los polisacáridos. En dicho estudio, el azul de toluidina, rojo congo y PAS se emplearon para evaluar el grado de plasmólisis, distribución de celulosa y polisacáridos en general, respectivamente.

El azul de toluidina es un colorante metacromático básico de tiazina con alta afinidad por los componentes ácidos del tejido, por lo que tiñe los tejidos ricos en ADN y ARN (Sridharan y Shankar, 2012). Mientras que, el rojo congo es un colorante a base de bencidina y se logra unir a la superficie de la celulosa por medio interacciones electrostáticas entre el grupo trióxido de azufre ( $-\text{SO}_3^-$ ) del rojo congo y el grupo OH de la celulosa. También, se logra la unión por medio de enlaces de hidrógeno entre el grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) del rojo congo y el átomo de oxígeno del éter de la celulosa (Samiey y Dargahi, 2010). Por otro lado, la tinción de PAS consiste en exponer el corte histológico al ácido periódico. El cual es un agente oxidante y al oxidar grupos químicos en el tejido produce aldehído. Este compuesto puede ser identificado al convertirlo en un complejo con la solución de Schiff, generando un color rojo magenta brillante (Hale, 1957). Como se mencionó anteriormente, estas tinciones han sido empleadas satisfactoriamente para analizar el grado de plasmólisis, celulosa y polisacáridos de tejidos vegetales. Por lo tanto, todas las tinciones que se mencionaron son útiles para analizar la presencia de alguna modificación celular como consecuencia de la crioconservación de vid.

### **3. HIPÓTESIS**

El proceso de criopreservación provoca alteraciones moleculares y celulares en la pared y membrana celular de embriones cigóticos de *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Identificar alteraciones moleculares y cambios en las estructuras celulares ocasionadas durante el proceso de criopreservación en embriones cigóticos de *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Realizar la criopreservación de embriones cigóticos de la vid de la variedad Red Globe.
- Determinar la viabilidad y regeneración a plántulas de los embriones cigóticos de la vid durante el proceso de criopreservación.
- Analizar los componentes y la integridad de la pared y membrana celular de los embriones cigóticos de la vid durante el proceso de criopreservación mediante histología.
- Cuantificar la expresión del gen expansina- $\alpha 1$  de los embriones cigóticos de la vid durante las diferentes etapas del proceso de criopreservación.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Protocolo de Crioconservación de Vid**

#### **5.1.1. Preparación del Material Vegetal**

El experimento se realizó con embriones cigóticos obtenidos de semillas de uva de la variedad Red Globe. Dicha fruta se obtuvo en cajas con aproximadamente 10 kg de fruta del mercado de abasto y de establecimientos comerciales locales de la ciudad de Hermosillo, Sonora. Antes de manipular las uvas, estas fueron lavadas con agua destilada y con jabón (detergente en polvo 123 Maxi Efecto, marca Henkel), y enjuagadas con agua destilada estéril tres veces.

Posteriormente, se extrajeron las semillas de la pulpa de las bayas y se colocaron dentro de una caja Petri estéril. Después, se realizó una prueba de viabilidad de semillas mediante flotación (Ugbede y Hamadina, 2018) en agua destilada, para separar las pseudo-semillas de las semillas llenas. Las semillas que flotaron se desecharon, y las que se sumergieron en el agua fueron lavadas con agua destilada y con jabón tres veces. Luego, las semillas se desinfectaron con etanol al 70% (v/v) por 1 min, después con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 7 min, y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.

#### **5.1.2. Extracción de Embriones Cigóticos de Vid**

Esta actividad se realizó dentro de una campana de flujo laminar (Horizontal Laminar Flow Cabinet, Esco Airstream<sup>®</sup>) bajo condiciones estériles con la ayuda de un bisturí y un estereoscopio (Daigger Scientific Inc.). En caso de ser necesario, las semillas se colocaron dentro de medio Murashige & Skoog para su maduración antes del tratamiento con ácido giberélico. Después, las semillas se trataron con 1000 ppm de ácido giberélico por 24 h a 25 °C para detener la dormancia

del embrión, con la excepción del tratamiento control que no recibió algún tratamiento. Al finalizar el tratamiento con ácido giberélico, las semillas fueron diseccionadas con la ayuda del bisturí y el estereoscopio dentro de la campana de flujo laminar. Posteriormente, se extrajeron los embriones (longitud aproximada de 1 a 3 mm) de cada semilla, y se colocaron dentro de tubos estériles de 2 mL para realizar la vitrificación.

Previo al tratamiento con ácido giberélico, se dividieron 1500 embriones en 15 tubos eppendorf, y estas réplicas se utilizaron como control + (T1) (sin algún tratamiento). Tres réplicas se sumergieron en solución fijadora de tejidos para los análisis histológicos, y las otras 12 réplicas se utilizaron para los análisis de viabilidad y expresión génica. Réplicas similares se utilizaron en los demás tratamientos: control - NL (T2) (exposición a nitrógeno líquido); exposición a PVS2 (T3); exposición a PVS2 y nitrógeno líquido (T4) (PVS2+NL); exposición a PVS2, nitrógeno líquido y recalentamiento (T5) (PVS2+NL+RC); exposición a PVS2, nitrógeno líquido, recalentamiento y solución de descarga (T6) (PVS2+NL+RC+SD) (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Distribución de muestras para los análisis de viabilidad, histología y expresión génica.

Tratamientos	Análisis				Total de réplicas
	Viabilidad con cloruro de tetrazolio*	Viabilidad por regeneración de plántulas*	Histología ↓	Expresión génica ↓	
T1: Control + (sin tratamiento)	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas
T2: Control – (NL)	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas
T3: Tratamiento con PVS2	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas
T4: PVS2 + NL	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas
T5: PVS2 + NL+RC	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas
T6: PVS2 + NL+RC+SD	5 réplicas	5 réplicas	3 réplicas	2 réplicas	15 réplicas

Cada réplica contiene 5 (\*) ó 100 (↓) embriones cigóticos de vid de la variedad Red Globe.

### 5.1.3. Crioconservación por Vitricación

Antes de iniciar este proceso, los embriones se separaron en tres réplicas colocando 100 embriones por réplica durante cada etapa de la crioconservación para cada análisis. Las condiciones de vitricación se realizaron de acuerdo a lo descrito por García-Coronado *et al.* (2016). Se utilizó la PVS2, que contiene 30% (p/v), glicerol, 15% (p/v) etilenglicol y 15% (p/v) DMSO en medio MS con 0.4 M sacarosa a un pH de 5.8 (Sakai *et al.*, 1990). Los embriones (15 réplicas con 100 embriones cada una) se sumergieron en PVS2 al 50% por 10 min a 25 °C y después en PVS2 al 100% por 10 min a 4 °C. Al finalizar la exposición a PVS2, los embriones se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de PVS2. Luego, tres réplicas se sumergieron en solución fijadora de tejidos que se utilizaron para los análisis histológicos y las otras 12 réplicas fueron destinadas para los análisis de viabilidad y expresión génica.

Posteriormente, durante la vitricación los demás embriones tratados con PVS2 (15 réplicas con 100 embriones cada una) se sumergieron en nitrógeno líquido a -196 °C durante 30 min (**Cuadro 3**). Inmediatamente después de este tiempo, tres réplicas se sumergieron en solución fijadora de tejidos que se utilizaron para los análisis histológicos, y las otras 12 réplicas fueron empleadas para los análisis de viabilidad y expresión génica.

Los embriones (control negativo) destinados para el tratamiento sólo con nitrógeno líquido (15 réplicas con 100 embriones cada una) fueron expuestos a nitrógeno líquido a -196 °C durante 30 min. Al finalizar los 30 min de exposición a NL, tres réplicas se sumergieron en solución fijadora de tejidos para los análisis histológicos y las otras 12 réplicas fueron empleadas para los análisis de viabilidad y expresión génica (**Cuadro 3**).

### 5.1.4. Recalentamiento

Al finalizar los 30 min de almacenamiento en nitrógeno líquido, los embriones (15 réplicas con 100 embriones cada una) se recalentaron a 38 °C en baño de María por tres minutos, y se eliminó la solución PVS2 restante mediante tres lavados con agua destilada estéril por 1 min. Tres réplicas

fueron sumergidas en solución fijadora de tejidos para los análisis histológicos y las otras 12 réplicas se utilizaron para los análisis de viabilidad y expresión génica (**Cuadro 3**).

Finalmente al último tratamiento, posterior al recalentamiento del tejido se utilizó la solución de descarga, que se compone de sacarosa al 1.2 M, a temperatura ambiente por 10 min. Tres réplicas fueron sumergidas en solución fijadora de tejidos para los análisis histológicos y las otras 12 réplicas se utilizaron para los análisis de viabilidad y expresión génica (**Cuadro 3**).

## 5.2. Análisis de Viabilidad de los Embriones

### 5.2.1. Análisis de Viabilidad Mediante Cloruro de Tetrazolio

Todos los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) fueron expuestos a la solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), para realizar el análisis de viabilidad de acuerdo a la metodología descrita por García-Coronado *et al.* (2016) y De Souza Grzybowski *et al.* (2012). Primero, los embriones se colocaron sobre papel filtro (VWR Brand 11 cm) impregnado con 5 mL de TTC al 1% dentro de cajas petri con un tiempo de incubación de 24 h a 30 °C en obscuridad. Después, la solución de TTC se eliminó y los tejidos se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, los embriones se observaron bajo un estereoscopio para visualizar el desarrollo del formazán (color rojo) el cual es indicador de viabilidad. Finalmente, el porcentaje de viabilidad se calculó mediante la siguiente fórmula (1):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(\# \text{ de embriones viables} \times 100)}{5} \quad (1)$$

donde # de embriones viables corresponde al número de embriones que desarrollaron un color rojo en el T1, T2, T3, T4, T5 ó T6.

### **5.2.2. Regeneración de Plántulas**

La metodología que se utilizó en este paso se realizó de acuerdo a lo descrito por García-Coronado *et al.* (2016). Dentro de una campana de flujo laminar horizontal, todos los embriones de los seis tratamientos destinados para este ensayo se colocaron dentro de un medio de cultivo para inducir la germinación. El medio de germinación contenía medio MS suplementado con 0.035 mg de ácido giberélico, 50 mg de mio-inositol, 50 mg de hidrolizado de caseína, 30 g de sacarosa, 8 g de agar y 3 g de carbón activado por litro de agua desionizada (García-Coronado *et al.*, 2016). Los embriones fueron incubados a 26 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad por 6 semanas en una cámara de crecimiento. Los resultados se expresaron en porcentaje de plántulas regeneradas, de acuerdo a la cantidad de plántulas que desarrollaron crecimiento en cada tratamiento.

## **5.3. Análisis Histológico de la Membrana y Pared Celular**

### **5.3.1. Preparación de los Cortes Histológicos**

De acuerdo a la metodología reportada por Zakaria *et al.* (2020), se realizaron los estudios histológicos con algunas modificaciones para todas las réplicas de los diferentes tratamientos. Primero, los tejidos de cada réplica trataron con una solución de fijación por siete días, que contiene una proporción de 10:1:2:7 de alcohol etílico al 95%, ácido acético glacial, formaldehído y agua, respectivamente. Después, los tejidos se deshidrataron con soluciones de etanol de 50, 70, 85, 98 y 100% (dos veces cada concentración) por 10 minutos. Luego, los tejidos fueron expuestos a xileno hasta tornarse transparentes. Posteriormente, los tejidos fueron colocados dentro de una mezcla de xileno y parafina por 30 min en un horno a 70 °C. Al retirar los tejidos del horno, estos se trataron con parafina por una hora a 70 °C antes de pasarlos a un molde. Se utilizó una estación de inclusión de parafina (Leica) para realizar la formación de los bloques. Al formar los bloques de parafina con la muestra, estos se colocaron dentro del congelador a -20 °C durante la noche.

Al siguiente día, los bloques fueron seccionados a 10µm con un micrótopo rotatorio (CUT 5062, SLEE medical GmbH) hasta obtener una tira delgada. Los cortes se montaron sobre un portaobjetos en un baño de agua tibia. Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar durante la noche en un horno a 40 °C.

### 5.3.2. Tinción de Tejidos

Al eliminar la parafina del portaobjetos con xileno, se realizó la tinción del corte histológico. Se utilizó la tinción de azul de toluidina (0.06% en agua destilada) para teñir la pared celular y poder visualizar el grado de plasmólisis, PAS para teñir polisacáridos en general y rojo congo (0.5% en agua destilada) para teñir la celulosa.

### 5.3.3. Análisis de Imagen

Todas las observaciones y capturas de imágenes de los cortes histológicos se realizaron con un microscopio óptico (DM750, Leica) con una cámara adaptada al microscopio (VE-LX1800, VELAB™) a un aumento de 100x. Las imágenes fueron tomadas de la región del hipocótilo del embrión cigótico, que es la parte donde menor manipulación y daño mecánico se le ocasiona al tejido. El procesamiento de la imagen y la cuantificación del porcentaje de plasmólisis que se observa con la tinción de azul de toluidina en los cortes histológicos se llevaron a cabo con el software ImageJ versión 1.53j. En la imagen se midió el área de la superficie y del citoplasma de cinco células por sección en tres secciones diferentes en cada imagen de cada tratamiento (Barraco *et al.*, 2014). El cálculo del porcentaje de plasmólisis se realizó con la fórmula (2):

$$\% \text{ de plasmolisis} = 100 - [(\text{área del citoplasma} \div \text{área de la célula}) \times 100] \quad (2)$$

donde área del citoplasma y de la célula corresponde al área medida con el programa ImageJ en las imágenes de los cortes histológicos teñidos con la tinción azul de toluidina del T1, T2, T3, T4, T5 ó T6.

#### 5.4. Análisis de Expresión Génica

La extracción de ARN total se realizó con el método de Hot Borate (Wan y Wilkins, 1994), y la síntesis del ADN complementario con el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Se cuantificó la expresión del gen EXPA1 (ID Ensembl plant VIT\_01s0026g02620) mediante RT-qPCR con el kit Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs) en el equipo QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), con el gen constitutivo GAPDH (GenBank CB973647) como control interno. Los primers del gen constitutivo y la EXPA1 (GAPDH, Sentido: 5'TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA3', Antisentido: 5'CCACAGACTTCATCGGTGACA3'; EXPA1, Sentido: 5'TCAATGCAAAGCGTCTTGACCTC3', Antisentido: 5'AGCCACCTCTTGAAACCACCTC3'), se diseñaron utilizando el programa QuantPrime (Arvidsson *et al.*, 2008). Finalmente, el análisis de expresión relativa se llevó a cabo con el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001).

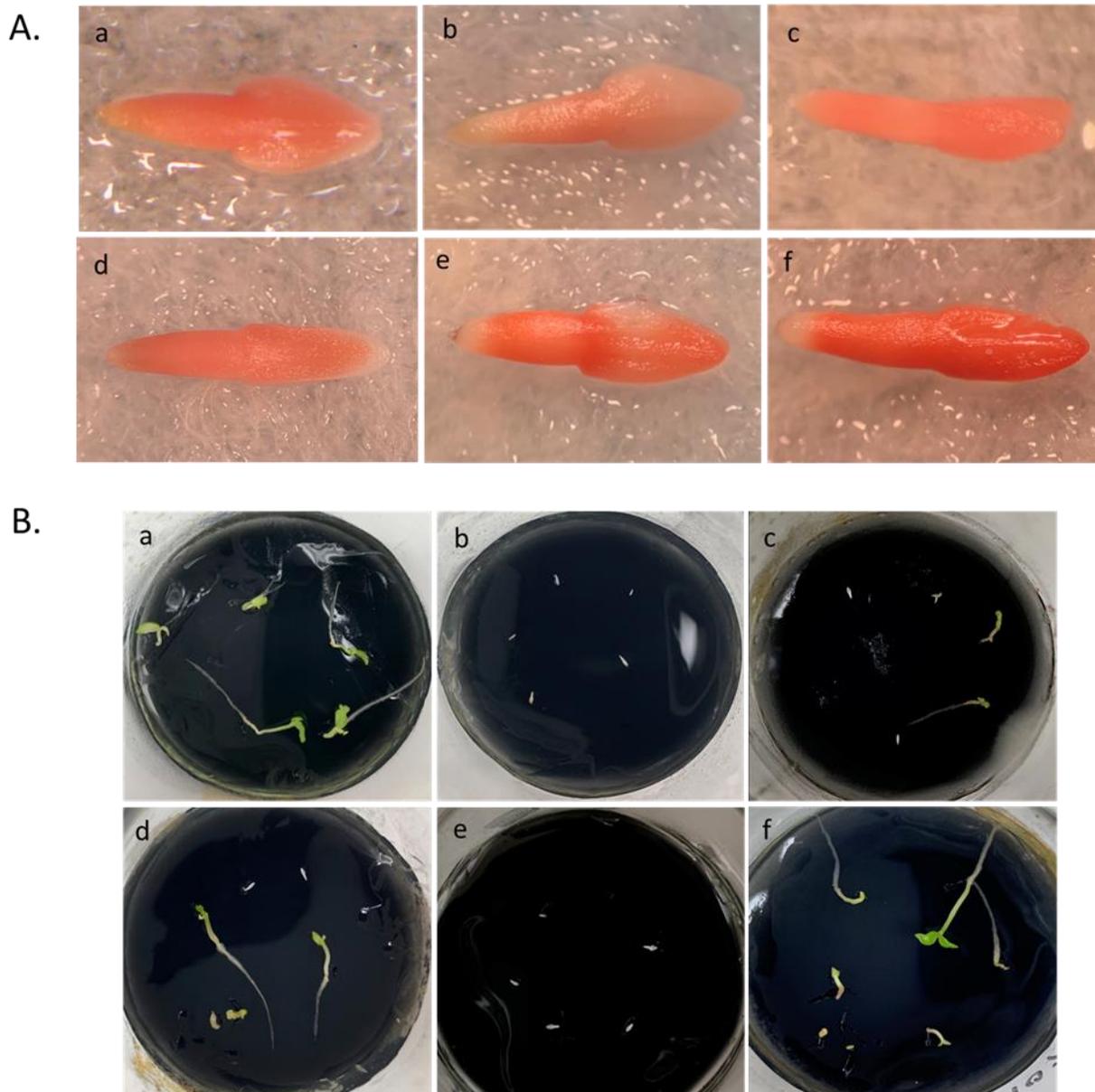
#### 5.5. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de los estudios de viabilidad e histología se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía en base a un diseño completamente al azar con un nivel de significancia del 95%. Las variables respuesta fueron: el porcentaje de viabilidad del análisis con TTC, el porcentaje de plántulas regeneradas, la expresión del gen EXPA1 y el porcentaje de plasmólisis, de acuerdo a los diferentes tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6). En caso de existir diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico NCSS (Statistical Number System, Kaysville UTA, EUA; versión 2021, v21.0.2).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis de Viabilidad en Embriones Cigóticos de Vid Durante la Crioconservación

La viabilidad de los embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe se vio afectada por diferentes etapas del protocolo de crioconservación. En el análisis de viabilidad con cloruro de tetrazolio (TTC) (**Figura 6A**), el control + (T1), exposición a PVS2 (T3) y PVS2+NL+RC+SD (T6) muestran un color rojo más brillante y uniforme en comparación con los otros tratamientos, control -, PVS2+NL, PVS2+NL+RC (T2, T4 y T5, respectivamente). El porcentaje de viabilidad (**Figura 7A**) fue igual en el control -, PVS2+NL, PVS2+NL+RC (T2, T4 y T5, respectivamente) con un valor de 68%, siendo el porcentaje de viabilidad más bajo de todos los tratamientos. El tratamiento con pura exposición a PVS2 (T3) mostró un porcentaje de viabilidad de 84%, mientras que el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6) tuvo un 92% de viabilidad. Estos dos tratamientos no mostraron diferencias significativas en comparación con el control + (T1), el cual reflejó un 100% de viabilidad.

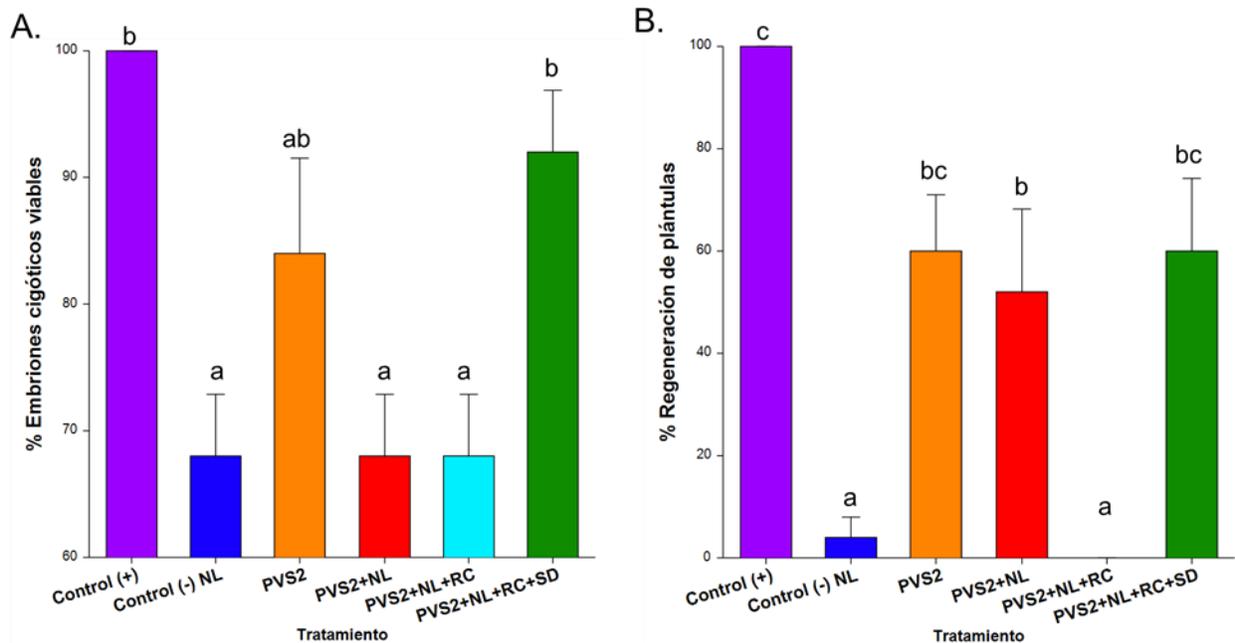


**Figura 6.** Análisis de viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe durante su crioconservación. **A.** Viabilidad de embriones cigóticos con cloruro de tetrazolio (TTC). **B.** Crecimiento de plántulas regeneradas a partir de embriones cigóticos de vid en medio de regeneración por 15 días. A: Control + (T1); b: Control – (NL) (T2); c: PVS2 (T3); d: PVS2+NL (T4); e: PVS2+NL+RC (T5); f: PVS2+NL+RC+SD (T6). PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M).

En cuanto a la viabilidad evaluada por medio de la regeneración de plántulas, se puede observar el crecimiento que tuvieron los embriones cigóticos después de 15 días en medio de regeneración (**Figura 6B y 7B**). El control + (T1) mostró un crecimiento óptimo de plántulas (100%), mientras

que el control – (T2) tuvo un crecimiento casi nulo (4%), como es de esperarse. La regeneración de las plántulas en el tratamiento donde se expone el tejido solamente a PVS2 (T3) y en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6) fue igual (60%), pero no resultó ser significativamente diferente al porcentaje de regeneración del control + (T1). En el tratamiento PVS2+NL (T4), el porcentaje de regeneración disminuyó (52%), pero la disminución no fue significativa con respecto al control – (T2) y al tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6), pero sí con respecto al control + (T1). El crecimiento de las plántulas en el tratamiento PVS2+NL+RC (T5) fue nulo (0%), por lo que fue muy similar al control – (T2).

El análisis de viabilidad con TTC es implementado para evaluar la viabilidad de semillas (De Souza Grzybowski *et al.*, 2012). Cuando el tejido es viable se desarrolla un compuesto llamado formazán, indicado por un color rojo brillante, gracias a la reducción de sales de tetrazolio por la respiración celular en la mitocondria del tejido. En cambio, cuando el tejido no es viable no existe la formación de formazán, y el tejido se muestra de un color blanco (França-Neto y Krzyzanowski, 2019; González-Vera *et al.*, 2019). En este estudio observamos que la viabilidad disminuyó por la exposición del tejido a NL (control-) y al recalentamiento (PVS2+NL+RC) (**Figura 7A**). La utilización de la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD) hizo posible que la viabilidad aumentara de manera significativa. Además, al utilizar la PVS2 (T3) la viabilidad del tejido no se vio afectada. Sin embargo, los resultados que se obtienen de la prueba de TTC no son totalmente indicativos de la viabilidad final del tejido, ya que las enzimas encargadas de metabolizar el formazán aún pueden estar activas en células muertas (Nausch y Buyel, 2021). Debido a esto, es necesario evaluar la regeneración de plántulas (Pinto *et al.*, 2016). Por lo que, también se decidió utilizar la prueba de regeneración de plántulas en este estudio para evaluar la viabilidad del tejido (**Figura 7B**).



**Figura 7.** Porcentajes de viabilidad de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe durante su criopreservación. **A.** Porcentaje de embriones cigóticos viables expuestos a cloruro de tetrazolio (TTC). **B.** Porcentaje de regeneración de plántulas a partir de embriones cigóticos de vid en medio de regeneración por 15 días. PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M). Las letras a, b y c muestran las diferencias significativas entre los tratamientos,  $p < 0.05$ .

En el análisis de regeneración de plántulas los resultados son similares a los que se obtuvieron con el análisis con TTC. Donde la viabilidad no se vio afectada de manera significativa con el uso de PVS2 (T2), pero sí cuando se expone el tejido a NL (control -) y al recalentamiento (PVS2+NL+RC). Además, se ve el aumento significativo de la viabilidad con el uso de la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD).

La principal diferencia entre los resultados de los dos análisis de viabilidad es que el tratamiento donde el tejido se expone a PVS2 (T3) y en el control - (T2), la viabilidad aumenta en la prueba de regeneración de plántulas. Esto posiblemente sea debido a que el cambio que presentó el tejido no fue tan severo gracias al uso de la PVS2 y el tejido fue capaz de regenerarse con el paso del tiempo. González-Arno *et al.* (2003) observaron algo similar a los resultados de este estudio al exponer embriones somáticos de cítricos a diferentes concentraciones de sacarosa. Mencionan que el alto contenido de polisacáridos ayuda a estabilizar las proteínas y la bicapa de fosfolípidos, lo cual ayuda a mantener la integridad de la célula. Además, gracias a que estos componentes se

mantuvieron estables, las células no fueron dañadas de manera severa y fueron capaces de recuperarse. Por lo que, es importante destacar que los resultados de la prueba de TTC se obtienen un día después de que el tejido recibe el tratamiento. En cambio, en la prueba de regeneración de plántulas los resultados se obtienen 15 días después de que el tejido tratado es puesto en medio de regeneración, dándole tiempo de que se recupere de alguna alteración.

Otro hallazgo importante de destacar es la disminución de la viabilidad del tejido por la exposición combinada a NL y al recalentamiento (PVS2+NL+RC), y el aumento de la viabilidad por el uso de la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD). Esta diferencia probablemente sea debido a la importancia del uso de la solución de descarga al colocar en medio de regeneración sólido, ya que ayudó a disminuir el estrés osmótico para mejorar la regeneración del tejido (Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020).

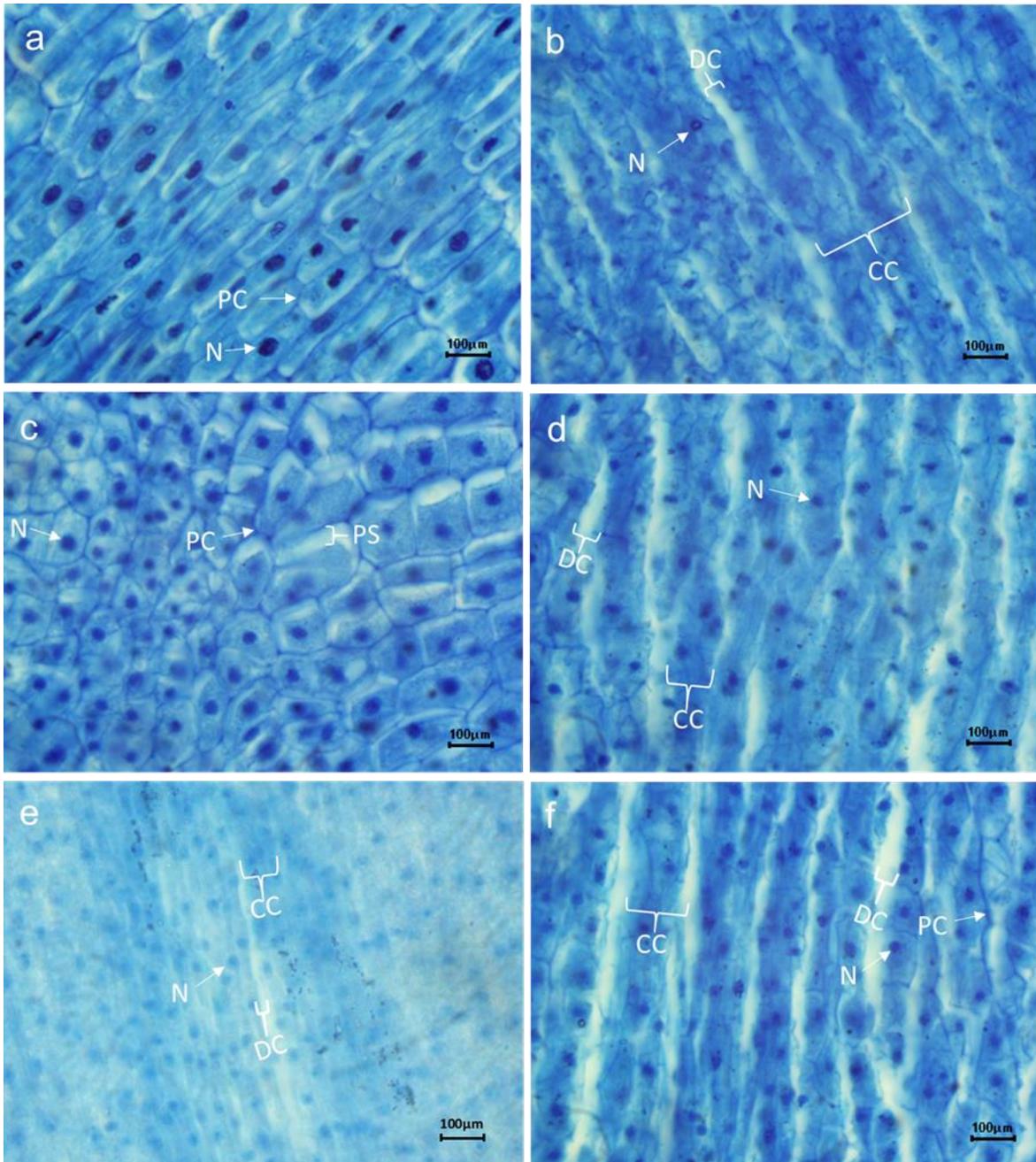
García-Cordero *et al.* (2016) y Lazo-Javalera *et al.* (2018) también evaluaron la viabilidad de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe criopreservados mediante la regeneración de plántulas. En el primer estudio se obtuvo una regeneración del 30% y en el segundo un 50% de regeneración al final del protocolo de criopreservación. En ambos estudios se utilizó el mismo protocolo de criopreservación que se implementó en este estudio, donde se observó un 60% de regeneración al final de la criopreservación. La diferencia entre los resultados de estos estudios podría deberse principalmente al daño mecánico que sufrió el tejido durante su manipulación. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que también pueda deberse a la edad y calidad del tejido que se utilizó en cada estudio.

Cabe destacar que, aún no se ha descrito un umbral de regeneración de plántulas indicativo de que el protocolo de criopreservación es óptimo para la conservación del tejido (Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, existen estudios donde evalúan la regeneración de tejido vegetal criopreservado donde obtuvieron porcentajes de regeneración entre 80 a 91% (Al-Ababneh *et al.*, 2002; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020; Nadarajan *et al.*, 2008; Normah *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2009; Wang y Deng, 2004; Whiteley *et al.*, 2016). Por lo que, aún se requiere evaluar las alteraciones que ocurren durante el protocolo de criopreservación de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe. Esto debido a que, el porcentaje de regeneración que se obtuvo en este estudio (60%) es considerado bajo en comparación con las otras investigaciones que se han realizado sobre la criopreservación de tejidos vegetales. Sin embargo, este porcentaje fue mejorado respecto a estudios previos (García-Coronado, *et al.*, 2016).

## 6.2. Análisis Histológico e Histoquímico en Embriones Cigóticos de Vid Crioconservados

### 6.2.1. Análisis Histológico y Determinación del Porcentaje de Plasmólisis

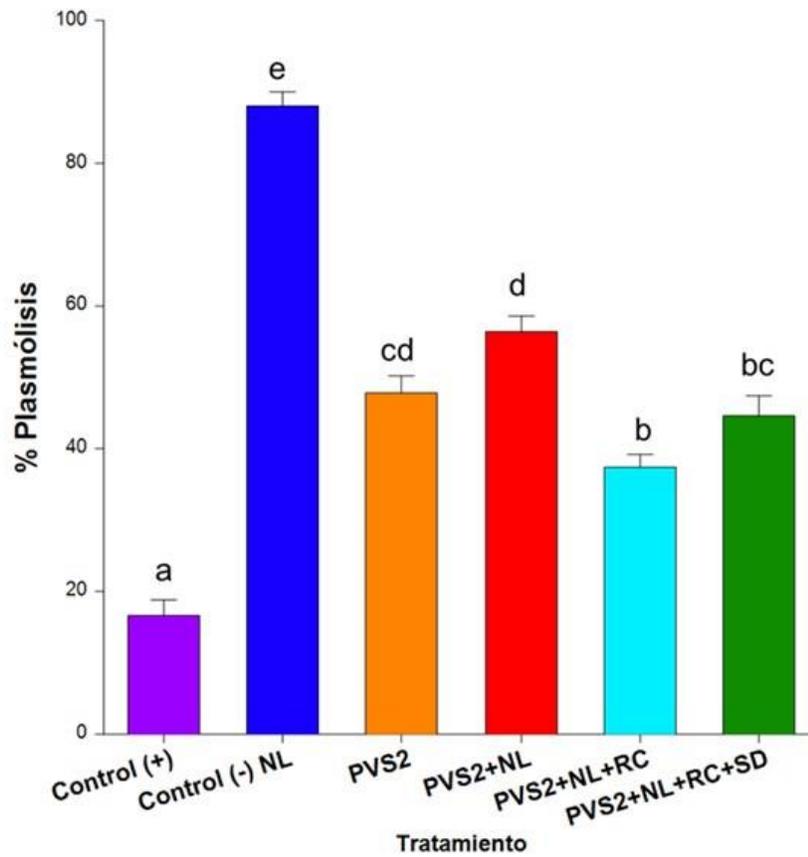
Los cortes histológicos de los embriones cigóticos de vid de la variedad Red Globe mostraron alteraciones severas de la integridad celular conforme avanzaba el proceso de la crioconservación. Mediante la tinción de azul de toluidina (**Figura 8**), se observó disminución de la integridad celular y el aumento del grado de plasmólisis de los embriones cigóticos a lo largo del proceso de la crioconservación (T1, T2, T3, T4, T5 y T6). En el control + (T1) (**Figura 8a**) se muestra la distribución normal de las células, donde el tejido está íntegro sin algún cambio. Mientras que en el control – (T2) (**Figura 8b**), se observa la destrucción de la integridad celular con la presencia de disrupción de la pared celular y una conglomeración de los componentes citoplasmáticos de la célula como consecuencia del congelamiento con NL.



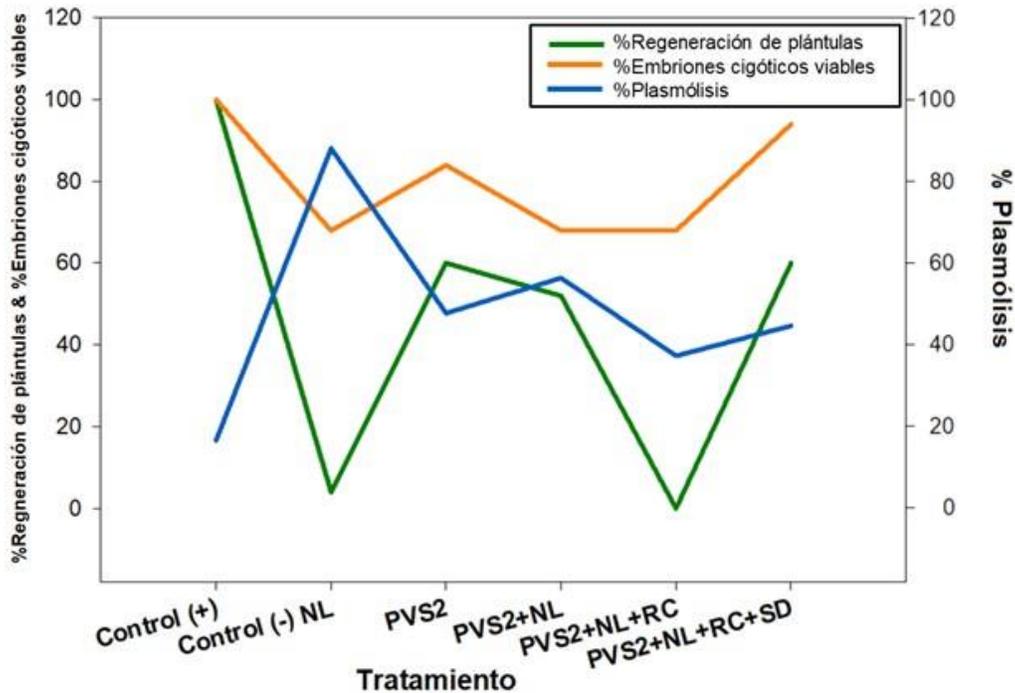
**Figura 8.** Cortes histológicos de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe teñidos con azul de toluidina. A: Control + (T1); b: Control – (NL) (T2); c: PVS2 (T3); d: PVS2+NL (T4); e: PVS2+NL+RC (T5); f: PVS2+NL+RC+SD (T6). PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M); PC: pared celular; N: núcleo; PS: plasmólisis; DC: disrupción celular; CC: conglomeración de componentes citoplasmáticos. Aumento = 100x. Barra = 100µm.

Con la exposición a PVS2 (T3) (**Figura 8c**), se visualiza la generación de plasmólisis, posiblemente

debido a la deshidratación que provoca el DMSO y glicerol que contiene la solución de PVS2. Además, estas sustancias han sido descritas como tóxicas, y posiblemente provoca alteraciones al tejido con su uso (Raju *et al.*, 2021; Lazo-Javalera *et al.*, 2017). Sin embargo, la alteración no fue tan severa para provocar ruptura de la pared celular. Por otro lado, en los tratamientos PVS2+NL, PVS2+NL+RC, PVS2+NL+RC+SD (T4, T5 y T6, respectivamente) (**Figura 8d, e y f**), donde el tejido es enfriado con nitrógeno líquido y expuesto al recalentamiento, presentó una disrupción de la pared celular y una conglomeración de los componentes citoplasmáticos de la célula. A pesar de esto, en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6) (**Figura 8f**) se logra visualizar algunas células con su pared celular íntegra debido a la posible recuperación del tejido posterior a la crioconservación. Como se mencionó, la tinción de azul de toluidina permite visualizar el grado de plasmólisis y con la ayuda del software ImageJ fue posible cuantificar el porcentaje de plasmólisis que se generó en cada tratamiento. El porcentaje de plasmólisis (**Figura 9**) se observó mayor en el control – (T2) (88.1%) y menor en el control + (T1) (16.7%), como es de esperarse debido a cuando el tejido no es expuesto a algún crioprotector previo a su congelamiento es altamente susceptible a sufrir muerte celular (Jang *et al.*, 2017). En el tratamiento donde solo se expone el tejido a PVS2 (T3), el porcentaje de plasmólisis aumentó de manera significativa (47.8%) con respecto al control + (T1), pero el cambio no fue tan grave para ocasionar ruptura celular. Al exponer el tejido a PVS2 y NL (T4), el porcentaje de plasmólisis aumentó (56.4%) causando ruptura de la pared celular, como se observó en la **Figura 8d**. Además, conforme aumenta significativamente el porcentaje de plasmólisis (88.1%) la capacidad del tejido de regenerarse disminuye (4%), lo cual se observa cuando el tejido es expuesto a NL (control –) (**Figura 10**). En el tratamiento PVS2+NL+RC (T5), el porcentaje de plasmólisis disminuyó (37.3%), lo cual es interesante, ya que no se observó regeneración de plántulas (0%) en este tratamiento (**Figura 10**). Sin embargo, en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6) al utilizar la solución de descarga, la viabilidad (94%) y regeneración (60%) del tejido no se vio afectada de manera significativa a pesar de presentar un porcentaje de plasmólisis ligeramente elevado (44.7%) (**Figura 10**). En la **Figura 8e**, se observa que el tejido sufrió un alto grado de alteración, ya que la tinción es ligera en comparación con los demás tratamientos, debido a la posible muerte celular en el tejido. En el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6), el grado de plasmólisis (44.7%) no fue tan severo con respecto al tratamiento PVS2+NL (T4) e incluso ligeramente menor al porcentaje de plasmólisis del tratamiento con pura exposición a PVS2 (T3), y es el tratamiento con un alto porcentaje de regeneración.



**Figura 9.** Porcentaje de plasmólisis en cortes histológicos de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe teñidos con azul de toluidina. PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M). Las letras a, b, c, d y e muestran las diferencias significativas entre los tratamientos,  $p < 0.05$ .



**Figura 10.** Comparación entre el porcentaje de plántulas regeneradas, porcentaje de embriones cigóticos viables y el porcentaje de plasmólisis en cortes histológicos de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe. PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M).

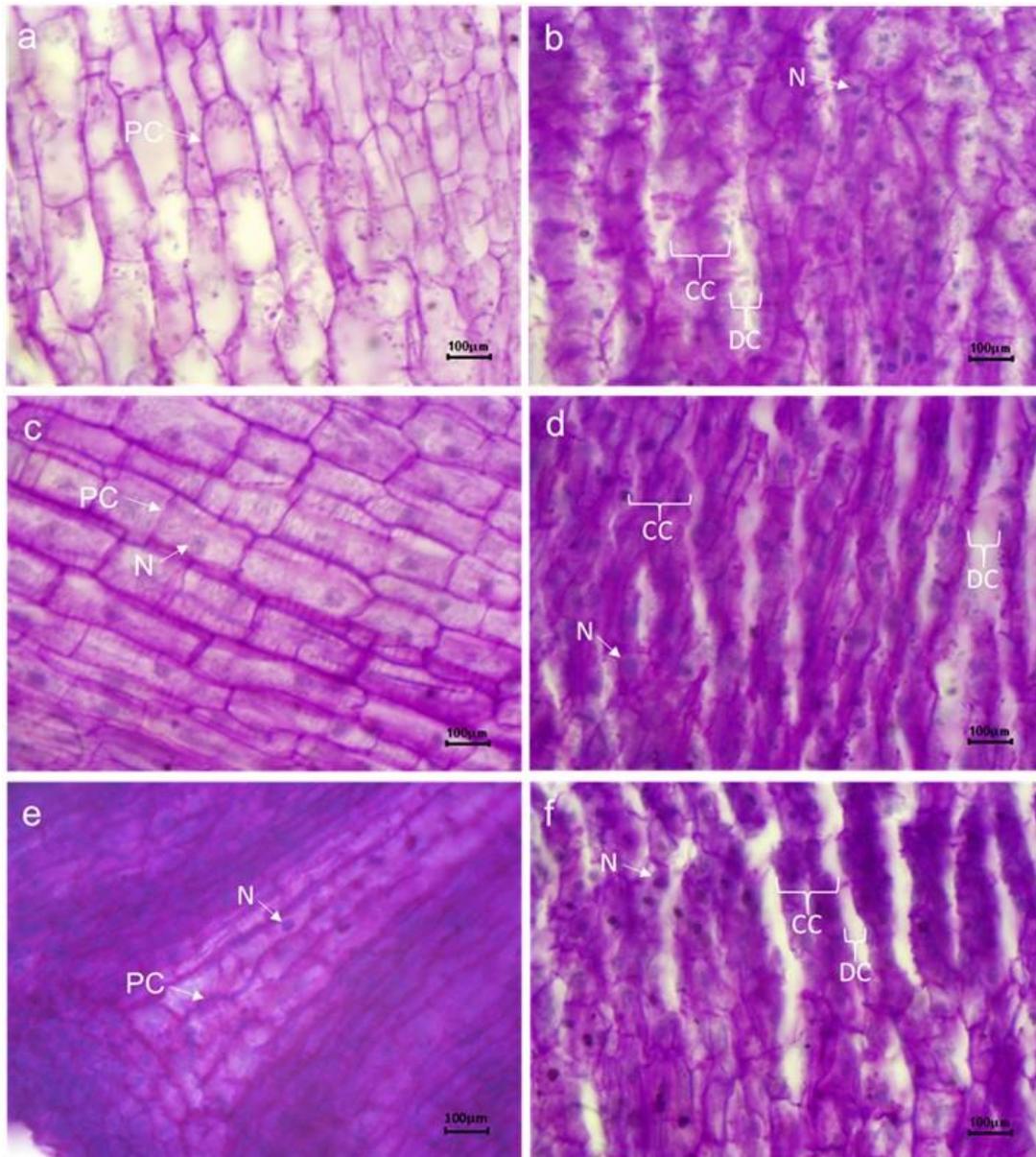
Los hallazgos de este estudio histológico demuestran que la PVS2, la exposición a NL y el recalentamiento provocan disrupción de la pared celular, conglomeración de los componentes citoplasmáticos y/o plasmólisis. De acuerdo a los diversos estudios histológicos, que se han realizado sobre los cambios que provoca la criopreservación en tejidos vegetales, el principal cambio que se observa en la mayoría de los estudios es la generación de plasmólisis provocada principalmente por el uso de soluciones de vitrificación (Barraco *et al.*, 2014; Bettoni *et al.*, 2019; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020; Mubbarakh *et al.*, 2014; Simão *et al.*, 2018; Volk *et al.*, 2017; Zakaria *et al.*, 2020). Esto debido a que, las soluciones de vitrificación contienen componentes que pueden ser tóxicos, como el DMSO y glicerol, y deshidratación de la célula (Raju *et al.*, 2021). Sin embargo, la alteración puede resultar mayor cuando no se implementa una solución de vitrificación al protocolo de criopreservación (Mubbarakh *et al.*, 2014). Esto debido a que, las soluciones de vitrificación son necesarias para lograr deshidratar el tejido adecuadamente para evitar la formación de cristales de hielo que ocasionan alteraciones a la integridad celular durante la exposición a NL y el recalentamiento (Fábián *et al.*, 2008; Mubbarakh *et al.*, 2014). Sin embargo, se requieren

estudios para establecer una concentración y tiempo de exposición adecuada a PVS2, donde las alteraciones que genere este crioprotector sean tolerables y el tejido sea capaz de regenerarse, y al mismo tiempo sea capaz de proteger el tejido durante la exposición al NL, y evitar la muerte celular. Zakaria *et al.* (2020) analizaron el efecto que tenía el proceso de crioconservación sobre los cuerpos similares a protocormos (PLBs) de orquídea mediante histología. Los resultados mostraron ser similares al presente estudio, ya que también encontraron un aumento de la generación de plasmólisis debido a la deshidratación celular, pero con el uso de silica gel y medio de osmoprotección dentro de su protocolo. Además, observaron la ruptura y colapso celular debido al enfriamiento y recalentamiento. De forma similar, este estudio presentó una disrupción celular y conglomeración de los componentes citoplasmáticos en los tratamientos donde se realizaron los tratamientos PVS2+NL, PVS2+NL+RC, y PVS2+NL+RC+SD (T4, T5 y T6, respectivamente). Afortunadamente, al colocar la solución de descarga, en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD (T6), el tejido se empieza a recuperar de las alteraciones y disminuye el porcentaje de plasmólisis. Esto también fue reportado por Simão *et al.* (2018) y Da Silva Cordeiro *et al.* (2020), cuando se colocó la solución de descarga después del recalentamiento. Esto demuestra el beneficio que tienen agregar la solución de descarga después del recalentamiento para reducir el estrés osmótico y eliminar adecuadamente la solución de vitrificación que resta en el tejido (Mubbarakh *et al.*, 2014). Sin embargo, la recuperación del tejido con la adición de la solución de descarga no fue suficiente en este estudio, ya que solo se obtuvo una regeneración de 60%. Probablemente debido a que las alteraciones provocadas por la vitrificación, exposición a NL y recalentamiento eran muy graves en algunas partes del tejido, causando que disminuyera la viabilidad (Zakaria *et al.*, 2020). No obstante, los hallazgos histológicos que se obtuvieron a partir de este análisis, que permitieron identificar los tipos de alteraciones que provoca cada etapa del protocolo de crioconservación, posiblemente ayudaran a establecer mejores condiciones para la crioconservación de embriones cigóticos de *V. vinifera* cv. Red Globe.

### **6.2.2. Análisis Histoquímico para la Determinación de la Distribución de Polisacáridos y Celulosa**

En los cortes histológicos de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe, teñidos con la tinción de

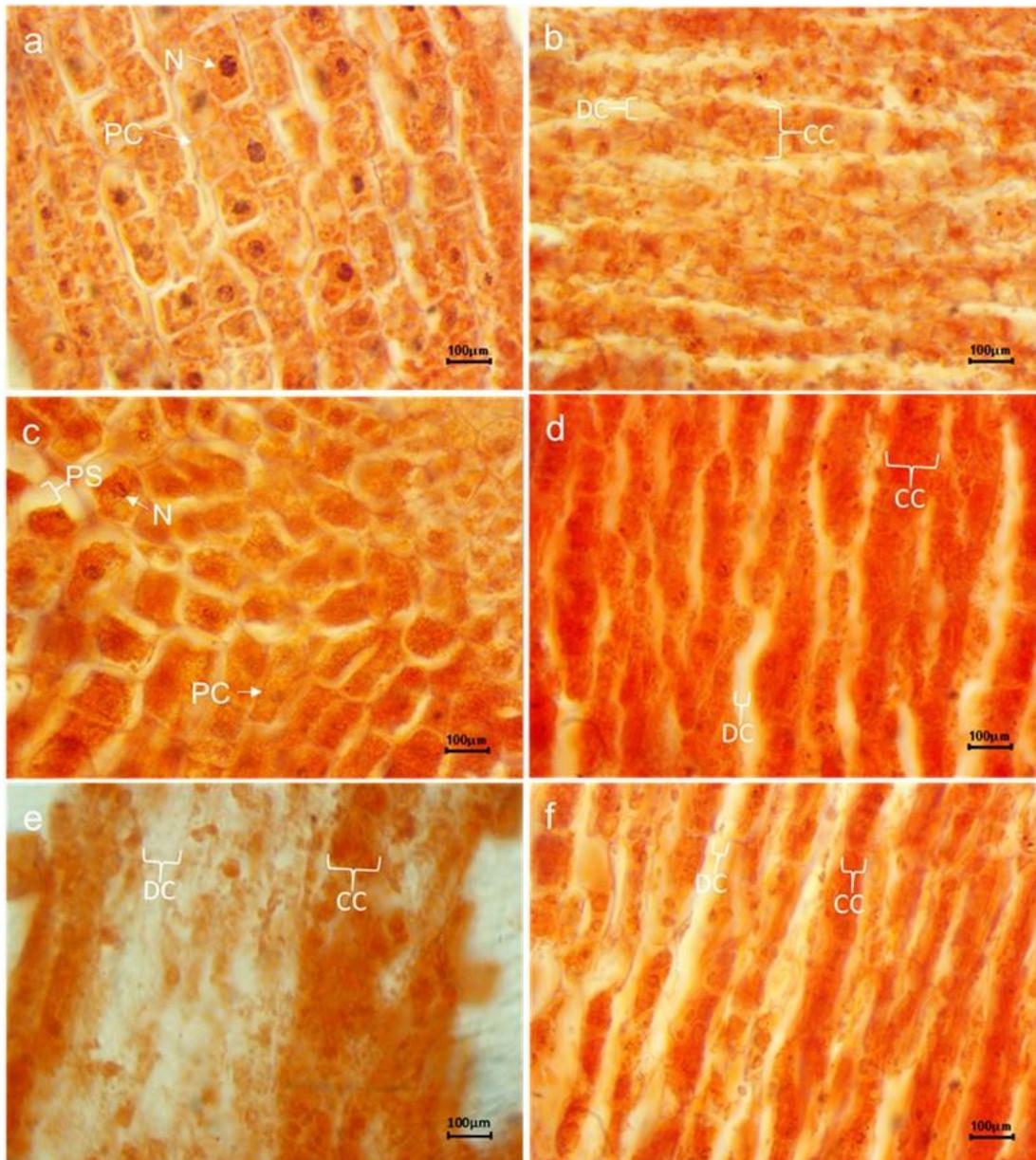
PAS, se observó la distribución de polisacáridos en el espacio celular durante los procesos de la criopreservación (**Figura 11**). En el control + (T1) (**Figura 11a**), los polisacáridos se encuentran principalmente en la área de la pared y membrana celular. En cambio, en el control – (T2) y conforme avanza el proceso de la criopreservación, PVS2 (T3), PVS2+NL (T4), PVS2+NL+RC (T5) y PVS2+NL+RC+SD (T6), se observa un aumento de polisacáridos en el citoplasma. Además, se visualiza disrupción celular en el control – (T2) y en los tratamientos PVS2+NL (T4) y PVS2+NL+RC+SD (T6) (**Figura 11b, d y f**). Esto posiblemente sea debido al uso de la solución de PVS2, la cual contiene sacarosa y glicerol que podrían interactuar con moléculas de la tinción (Hale, 1957). De igual manera, en el T6 se utilizó la solución de PVS2 y una solución de descarga (sacarosa 1.2 M) después del recalentamiento. Sin embargo, el control – (T2) no se expone el tejido a la solución PVS2 ó a la solución de descarga, solamente se expuso el tejido con nitrógeno líquido por 30 min. Es por esto que, no se descarta que el aumento de polisacáridos dentro del espacio intercelular sea consecuencia de las modificaciones que sufre el tejido por el enfriamiento y/o el recalentamiento, provocando la ruptura de la pared celular y conglomeración de los componentes citoplasmáticos.



**Figura 11.** Cortes histológicos de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe teñidos con PAS. a: Control + (T1); b: Control – (NL) (T2); c: PVS2 (T3); d: PVS2+NL (T4); e: PVS2+NL+RC (T5); f: PVS2+NL+RC+SD (T6). PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M); PC: pared celular; N: Núcleo; PS: Plasmólisis; DC: Disrupción celular; CC: Conglomeración de componentes citoplasmáticos. Aumento = 100x. Barra = 100µm.

Los cortes histológicos de los embriones cigóticos de vid cv. Red Globe teñidos con rojo congo muestran la distribución de la celulosa en el tejido (**Figura 12**), debido a que este colorante se une a la celulosa presente en la célula (Herrera-Ubaldo y de Folter, 2018). La celulosa es un

polisacárido de la pared celular que le aporta rigidez y resistencia (Carpita y Gibeaut, 1993). En el control + (T1) (**Figura 12a**) se visualizaron las células del tejido íntegras, ya que la pared celular delimita perfectamente el perímetro de la célula y se logran observar los núcleos al centro de la célula. Así mismo, el citoplasma teñido de color rojo indicó la presencia de celulosa dentro del citoplasma. De igual manera, en el tratamiento donde se expone el tejido solo a PVS2 (T3) (**Figura 12c**), el citoplasma de la célula también presentó tinción de un color rojo, pero más brillante que el del control + (T1). Esto podría ser debido al uso de la solución PVS2, la cual contiene sacarosa, y podría interactuar con los grupos  $-\text{SO}_3^-$  y amino del colorante (Samiey y Dargahi, 2010). Además, en esta misma imagen se observó una separación entre la pared celular y el citoplasma debido a la generación de plasmólisis, lo que también se presenta en la tinción de azul de toluidina con el mismo tratamiento, exposición a PVS2 (T3) (**Figura 8c**).



**Figura 12.** Cortes histológicos de embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe teñidos con rojo congo. a: Control + (T1); b: Control - (NL) (T2); c: PVS2 (T3); d: PVS2+NL (T4); e: PVS2+NL+RC (T5); f: PVS2+NL+RC+SD (T6). PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M); PC: pared celular; N: núcleo; PS: plasmólisis; DC: disrupción celular; CC: conglomeración de componentes citoplasmáticos. Aumento = 100x. Barra = 100µm.

Mientras que en los tratamientos donde se expuso a PVS2 (T3), PVS2+NL (T4), PVS2+NL+RC (T5) (**Figura 12b, d, e y f**), presentaron una disrupción celular y conglomeración de los componentes citoplasmáticos, por lo que no se logra distinguir el perímetro de la célula ni sus

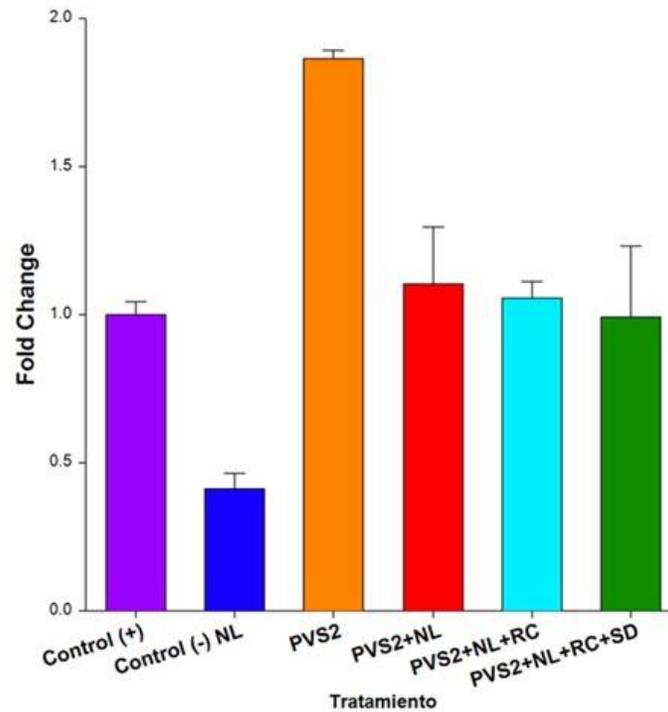
componentes. En el tratamiento PVS2+NL+RC (T5) (**Figura 12d**), se observan partes del tejido con una tinción muy ligera, igual como se observó con la tinción de azul de toluidina del mismo tratamiento (**Figura 8e**), probablemente debido a la muerte celular causando degradación parcial de la celulosa. Este mismo tratamiento, con la tinción de PAS (**Figura 11e**), se muestra todo el espacio celular teñido de un color morado brillante, a diferencia a como se observó con la tinción de azul de toluidina y rojo congo. Esto posiblemente sea debido a que la tinción de PAS tiñe los polisacáridos en general y la tinción de rojo congo es específica para la celulosa. Por lo que, en la tinción de PAS los colorantes se estén uniendo a los polisacáridos presentes en la célula por el uso de la PVS2.

La pared celular está principalmente compuesta por polisacáridos, siendo divididos en celulosas, pectinas y hemicelulosas, que se encargan del crecimiento y mantenimiento de la integridad de la pared celular (Voiniciuc *et al.*, 2018). La celulosa, el polisacárido más abundante en la pared celular de las plantas (Zeng *et al.*, 2017). Es por esto que es importante saber la distribución de estos componentes durante el proceso de crioconservación de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. Da Silva Cordeiro *et al.* (2020) evaluaron el efecto que tenía el protocolo de crioconservación y vitrificación-encapsulación sobre raíces de *Tarenaya rosea* mediante histología e histoquímica, y observaron un aumento de plasmólisis con el uso de la solución de vitrificación, en su caso PVS3, la cual solo contiene glicerol y sacarosa, en lugar de PVS2. En el análisis histoquímico reportaron un aumento de polisacáridos, proteínas, lípidos y pectinas en el espacio intercelular durante la crioconservación. De forma similar, en el presente estudio con las tinciones de PAS y rojo congo, los resultados mostraron un aumento de polisacáridos en general y celulosa, respectivamente, a lo largo del proceso de la crioconservación.

### 6.3. Análisis de la Expresión del Gen EXPA1 Durante la Crioconservación en Embriones Cigóticos de Vid

Las expansinas son proteínas de la pared celular encargadas de la elongación celular, y se conocen dos familias de expansinas,  $\alpha$  y  $\beta$  (Cosgrove *et al.*, 2002). En el presente estudio la expresión del gen EXPA1 (**Figura 13**), el cual pertenece a la familia de las expansinas  $\alpha$ , se vio con una tendencia a ser inducido con el uso exclusivo de la PVS2 (T3:  $1.86 \pm 0.04$ ) y reprimido cuando el tejido fue

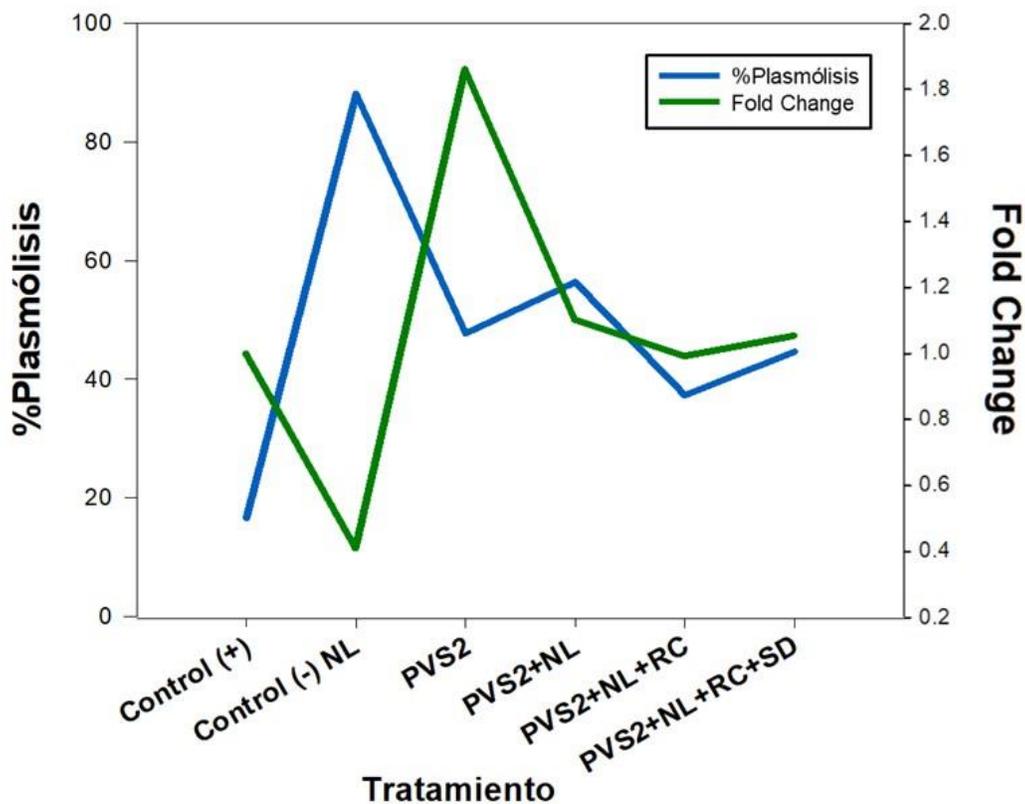
expuesto solo a NL, control (-), (T2:  $0.41 \pm 0.07$ ). En los tratamientos PVS2+NL, PVS2+NL+RC, PVS2+NL+RC+SD (T4:  $1.10 \pm 0.27$ ; T5:  $0.99 \pm 0.34$ ; T6:  $1.06 \pm 0.08$ ), la expresión del gen EXPA1 fue similar con respecto al control + (T1:  $1.00 \pm 0.06$ ).



**Figura 13.** Expresión del gen EXPA1 durante el protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M).

Resultados similares fueron reportados por Quijada-Rivera (2021), dónde se visualizó la represión del gen EXPA1 en el análisis transcriptómico posterior a la exposición a PVS2, NL y el recalentamiento de los embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe crioconservados. Sin embargo, nuestros resultados indican que posterior a la exposición a PVS2, NL y el recalentamiento, la expresión de EXPA1 es similar. Además, la inducción del gen durante la exposición a PVS2 (T3) (**Figura 8c**) podría ser debido a que inicia la inducción de plasmólisis dentro de la célula, como se observó en el análisis comparativo entre ambos estudios (**Figura 14**). En el mismo estudio comparativo se muestra que la expresión del gen EXPA1 en el control – (T2) disminuía cuando aumentaba significativamente el porcentaje de plasmólisis (88.1%) (**Figura 14**).

Mientras que, en el tratamiento PVS2 (T3) el porcentaje de plasmólisis disminuye (47.8%) y el gen EXPA1 es reprimido. En los tratamientos PVS2+NL (T4), PVS2+NL+RC (T5) y PVS2+NL+RC+SD (T6) el porcentaje de plasmólisis se mantiene, y la expresión del gen EXPA1 se mantiene similar al control + (T1) (**Figura 14**). Existen estudios donde se ha analizado la expresión de genes asociados a la pared y membrana celular durante el protocolo de crioconservación. Seo *et al.* (2018), observó una inducción de los genes codificantes para la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana celular y la proteína de pared celular rica en prolina durante la exposición a PVS2 en puntas de brote de *Solanum tuberosum* cv. Superior. Por otro lado, Chen *et al.* (2021) reportó que el gen pectina metilesterasa, encargado de mantener la homeostasis de la pared celular y regular el crecimiento de la planta (Wang *et al.*, 2021), fue reprimido durante la deshidratación con PVS2 y vitrificación en callos embriogénicos de *Agapanthus praecox*.



**Figura 14.** Comparación entre la expresión del gen EXPA1 y porcentaje de plasmólisis durante el protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. PVS2: solución de vitrificación vegetal 2; NL: nitrógeno líquido; RC: recalentamiento; SD: solución de descarga (sacarosa 1.2 M).

Liu *et al.* (2019) y Zhang *et al.* (2018) observaron que el gen de la EXPA1 es inducido por el estrés por frío. En cambio, en nuestra investigación cuando el tejido es expuesto a NL solamente, control - (T2), el gen EXPA1 tiende a ser reprimido. Esto podría deberse al efecto que tiene el NL sobre el tejido, donde enfría (-196 °C) de manera inmediata el tejido e inactiva los procesos celulares (Bekheet *et al.*, 2020). En contraste, en el estrés por frío la disminución de la temperatura es gradual y no tiende a llegar a -196 °C (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Además, no hay que descartar que la represión del gen sea debido a la muerte celular en el tejido, ya que los porcentajes de viabilidad y regeneración del control – (T2) (**Figura 10 y 14**) fueron los muy bajos (TTC: 68%; regeneración de plántulas: 4%). La información obtenida de este análisis podría ayudar a esclarecer el modelo de regulación del gen EXPA1, ya que sigue siendo ambiguo (Liu *et al.*, 2019).

## 7. CONCLUSIONES

Los procesos de enfriamiento, recalentamiento y exposición a NL que se realizaron dentro del protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe provocaron alteraciones a la integridad de la célula, como disrupción de la pared celular y una conglomeración de los componentes celulares del citoplasma. Dichas alteraciones provocaron la disminución de la viabilidad del tejido. Así como, el aumento de polisacáridos en general y celulosa en el espacio intercelular. Además, la exposición a PVS2 y NL provoca cambios en la expresión del gen EXPA1. Estos resultados brindan claridad sobre la posible relación de la expansina- $\alpha$ 1 en la respuesta del tejido crioconservado y las alteraciones citotóxicas a nivel de membrana y pared celular que provocan las distintas etapas del protocolo de crioconservación en embriones cigóticos de *V. vinifera* L. cv. Red Globe.

## 8. RECOMENDACIONES

Debido a que aún se requiere establecer un protocolo de criopreservación óptimo para criopreservación de embriones cigóticos *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe. Estos resultados ayudarán a identificar las etapas de la criopreservación donde el tejido es más susceptible a sufrir alteraciones, para la optimización del protocolo de criopreservación. Además de que esta investigación aporta a elucidar la posible función de la expansina- $\alpha$ 1 en las respuestas del tejido a la criopreservación.

## 9. REFERENCIAS

- Al-Ababneh, S. S., Karam, N. S. y Shibli, R. A. (2002). Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(6), 602-607.
- Alenazi, M. M., Shafiq, M., Alobeed, R. S., Alsdon, A. A., Abbasi, N. A., Ali, I., Mubushar, M. y Javed, I. (2019). Application of abscisic acid at veraison improves red pigmentation and accumulation of dietary antioxidants in red table grapes cv. Red Globe at harvest. *Scientia Horticulturae*, 257, 108672.
- Baek, K.-H. y Skinner, D. Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165(6), 1221-1227.
- Barraco, G., Sylvestre, I., Collin, M., Escoute, J., Lartaud, M., Verdeil, J.-L. y Engelmann, F. (2014). Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation–dehydration. *Protoplasma*, 251(1), 177-189.
- Bekheet, S. A., Sota, V., El-Shabrawi, H. M. y El-Minisy, A. M. (2020). Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 2.
- Benson, E. E. (2008). Cryopreservation Theory. En B. M. Reed (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* (pp. 15-32). Nueva York, NY: Springer New York.
- Bettoni, J. C., Bonnart, R., Shepherd, A., Kretschmar, A. y Volk, G. (2019). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) shoot tips from growth chamber-sourced plants and histological observations. *Vitis*, 58, 71-78.
- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- Chen, G., Li, R. y Shen, X. (2021). ApSerp-ZX from *Agapanthus praecox*, is a potential cryoprotective agent to plant cryopreservation. *Cryobiology*, 98, 103-111.
- Christensen, J. M. y Tiersch, T. R. (2005). Cryopreservation of channel catfish sperm: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. *Theriogenology*, 63(8), 2103-2112.
- Colombo, F., Di Lorenzo, C., Regazzoni, L., Fumagalli, M., Sangiovanni, E., Peres de Sousa, L., Bavaresco, L., Tomasi, D., Bosso, A., Aldini, G., Restani, P. y Dell'Agli, M. (2019). Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Food & Function*, 10(4), 1797-1807.
- Cosgrove, D. J., Li, L. C., Cho, H.-T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R. C. y Blecker, D. (2002). The Growing World of Expansins. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1436-1444.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850-861.
- Creasy, L. y Creasy, M. (2018). Grape Anatomy and Physiology. En (Segunda ed., pp. 1-295). Londres, UK: CAB International.

- Da Silva Cordeiro, L., Collin, M., Callado, C. H., Simões-Gurgel, C., Albarello, N. y Engelmann, F. (2020). Long-term conservation of *Tarenaya rosea* (Cleomaceae) root cultures: histological and histochemical analyses during cryopreservation using the encapsulation-vitrification technique. *Protoplasma*, 257(4), 1021-1033.
- De Souza Grzybowski, C., de Castro Ohlson, O., Carvalho da Silva, R. y Panobianco, M. (2012). Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(1), 47-54.
- Dulloo, M. E., Ebert, A. W., Dussert, S., Gotor, E., Astorga, C., Vasquez, N., Rakotomalala, J. J., Rabemifara, A., Eira, M., Bellachew, B., Omondi, C., Engelmann, F., Anthony, F., Watts, J., Qamar, Z. y Snook, L. (2009). Cost Efficiency of Cryopreservation as a Long-Term Conservation Method for Coffee Genetic Resources. *Crop Science*, 49(6), 2123-2138.
- Elavarthi, S. y Martin, B. (2010). Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Methods in Molecular Biology*, 639, 273-281.
- Fábián, A., Jäger, K., Darkó, É. y Barnabás, B. (2008). Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 737-744.
- FAOSTAT. (2019). Dirección de Estadística. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fennell, A. (2004). Freezing Tolerance and Injury in Grapevines. *Journal of Crop Improvement*, 10(1-2), 201-235.
- França-Neto, J. y Krzyzanowski, F. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366.
- Furt, F., Simon-Plas, F. y Mongrand, S. (2011). Lipids of the Plant Plasma Membrane. A. S. Murphy, B. Schulz, & W. Peer (Eds.), *The Plant Plasma Membrane* (pp. 3-30). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ganino, T., Silvanini, A., Beghé, D., Benelli, C., Lambardi, M. y Fabbri, A. (2012). Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 56(1), 78-82.
- García-Águila, L., Fera, M. d. y Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Bioteconología vegetal*, 7(2), 67-69.
- 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 Crioconservados. (Maestría en Ciencias), Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- García-Coronado, H., María-Elena, B.-F., Troncoso-Rojas, R., Rivera Domínguez, M. y Tiznado-Hernández, M. (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 B*, 6.
- González-Arno, M. T., Juárez, J., Ortega, C., Navarro, L. y Duran-Vila, N. (2003). Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo Letters*, 24(2), 85-94.
- Gonzalez-Arno, M. T., Martinez-Montero, M. E., Cruz-Cruz, C. A. y Engelmann, F. (2014).

Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity. In M. R. Ahuja & K. G. Ramawat (Eds.), *Biotechnology and Biodiversity* (pp. 129-170). Cham: Springer International Publishing.

- González Vera, M. J., Zanatta Aumonde, T., Meneghello, G. E., Noguez Martins, A. B., Aquino, Y. y Peña, P. (2019). Protocolo de análisis de viabilidad de semillas de chía mediante test de tetrazolio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1481-1489.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., Liebner, F., Schuhmacher, R. y Forneck, A. (2015). Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiology and Biochemistry*, 88, 17-26.
- Hale, A. J. (1957). The Histochemistry of Polysaccharides. En G. H. Bourne & J. F. Danielli (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 6, pp. 193-263): Academic Press.
- Heinitz, C. C., Uretsky, J., Dodson Peterson, J. C., Huerta-Acosta, K. G. y Walker, M. A. (2019). Crop Wild Relatives of Grape (*Vitis vinifera* L.) Throughout North America. En S. L. Greene, K. A. Williams, C. K. Khoury, M. B. Kantar, & L. F. Marek (Eds.), *North American Crop Wild Relatives, Volume 2: Important Species* (pp. 329-351). Cham: Springer International Publishing.
- Hellín, P., Manso, A., Flores, P. y Fenoll, J. (2010). Evolution of Aroma and Phenolic Compounds during Ripening of 'Superior Seedless' Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6334-6340.
- Herrera-Ubaldo, H. y de Folter, S. (2018). Exploring Cell Wall Composition and Modifications During the Development of the Gynoecium Medial Domain in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 9(454).
- Hnilickova, H., Hnilička, F., Orsák, M. y Hejnak, V. (2019). Effect of salt stress on growth, electrolyte leakage, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content in selected plant species. *Plant, Soil and Environment*, 65.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R. y Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12-18.
- Jeyanthi, J., James Antony, J., Chan, L., Xavier, R., Marimuthu, S. y Subramaniam, S. (2011). Effect of preculture and PVS2 incubation conditions followed by histological analysis in the cryopreserved PLBs of Dendrobium Bobby Messina orchid. *Australian Journal of Crop Science*, 5.
- Kaczmarczyk, A., Funnekotter, B., Menon, A., Phang, P., Al-Hanbali, A., Bunn, E. y Mancera, R. (2012). Current Issues in Plant Cryopreservation. En Igor I. Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology* (pp. 417-438). Croacia: INTECH.
- Kaity, A., Ashmore, S. E., Drew, R. A. y Dulloo, M. E. (2008). Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports*, 27(9), 1529-1539.
- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F. y Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. En M. A. Matzke & A. J. M. Matzke (Eds.), *Plant Gene Silencing* (pp. 59-68). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Kuki, H., Higaki, T., Yokoyama, R., Kuroha, T., Shinohara, N., Hasezawa, S. y Nishitani, K. (2017). Quantitative confocal imaging method for analyzing cellulose dynamics during cell wall regeneration in *Arabidopsis mesophyll* protoplasts. *Plant Direct*, 1(6), e00021.
- Kulus, D., Rewers, M., Serocka, M. y Mikula, A. (2019). Cryopreservation by encapsulation-dehydration affects the vegetative growth of chrysanthemum but does not disturb its chimeric structure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138(1), 153-166.
- Lambardi, M., Fabbri, A. y Caccavale, A. (2000). Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Reports*, 19(3), 213-218.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., Rocha-Granados, M., 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., Islas-Osuna, M. A., Oñate-Hernández, M. 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, 380-386.
- Lazo-Javalera, M. F., Astorga, K., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M., Islas-Osuna, M., Oñate-Hernandez, M., Martínez-Montero, M. E. y Rivera Domínguez, M. (2017). Effect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. `Flame Seedless . *Investigación y Ciencia 1665-4412*, 25, 36-44.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M., Islas-Osuna, M., Oñate-Hernandez, M., Martínez-Montero, M. y Rivera-Domínguez, M. (2018). Análisis de la pérdida iónica de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) criopreservadas. *Biocencia*, 20(3), 17-22.
- Leonard, R. T. y Hodges, T. K. (1980). The Plasma Membrane. N. E. Tolbert (Ed.), *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (Vol. 1, pp. 163-182). Nueva York: Academic Press, Inc.
- Li, B.-Q., Feng, C.-H., Wang, M.-R., Hu, L.-Y., Volk, G. y Wang, Q.-C. (2015). Recovery patterns, histological observations and genetic integrity in *Malus* shoot tips cryopreserved using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration procedures. *Journal of Biotechnology*, 214, 182-191.
- Liu, G.-T., Wang, J.-F., Cramer, G., Dai, Z.-W., Duan, W., Xu, H.-G., Wu, B.-H., Fan, P.-G., Wang, L.-J. y Li, S.-H. (2012). Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during and after recovery from heat stress. *BMC Plant Biology*, 12(1), 174.
- Liu, Y., Zhang, L., Hao, W., Zhang, L., Liu, Y. y Chen, L. (2019). Expression of Two  $\alpha$ -Type Expansins from *Ammopiptanthus nanus* in *Arabidopsis thaliana* Enhance Tolerance to Cold and Drought Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5255.
- 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(4), 402-408.
- Martínez-Montero, M. E., Mora, N., Quiñones, J., González-Arno, M. T., Engelmann, F. y Lorenzo, J. C. (2002). Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of

- cell membranes of sugarcane (*Saccharum sp.*) embryogenic calluses. *Cryo Letters*, 23(4), 237-244.
- Merritt, D. J. y Dixon, K. W. (2011). Restoration Seed Banks—A Matter of Scale. *Science*, 332(6028), 424-425.
- Morales Cruz, A., Aguirre Liguori, J., Zhou, Y., Minio, A., Riaz, S., Walker, A. M., Cantu, D. y Gaut, B. S. (2021). Extensive introgression among North American wild grapes (*Vitis*) fuels biotic and abiotic adaptation. *bioRxiv*, 2021.2002.2011.430822.
- Morsomme, P. y Boutry, M. (2000). The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1), 1-16.
- Mubbarakh, S. A., Rahmah, S., Rahman, Z. A., Sah, N. N. M. y Subramaniam, S. (2014). Cryopreservation of Brassidium Shooting Star Orchid Using the PVS3 Method Supported with Preliminary Histological Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 1131-1145.
- Nadarajan, J., Mansor, M., Krishnapillay, B., Staines, H. J., Benson, E. E. y Harding, K. (2008). Applications of differential scanning calorimetry in developing cryopreservation strategies for *Parkia speciosa*, a tropical tree producing recalcitrant seeds. *Cryo Letters*, 29(2), 95-110.
- Nausch, H. y Buyel, J. F. (2021). Cryopreservation of plant cell cultures – Diverse practices and protocols. *New Biotechnology*, 62, 86-95.
- 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(1), 67-73.
- Normah, M. N., Sulong, N. y Reed, B. M. (2019). Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. *Cryobiology*, 87, 1-14.
- Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Gülcü, M., Uslu, N. y Geçgel, Ü. (2017). Determination of bioactive compounds and mineral contents of seedless parts and seeds of grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 38, 212-220.
- Parkhey, S., Naithani, S. C. y Keshavkant, S. (2012). ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 261-267.
- Pezzuto, J. M. (2008). Grapes and human health: a perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6777-6784.
- Pinto, M. D. S., Paiva, R., Silva, D. P. C. D., Santos, P. A. A., Freitas, R. T. D. y Silva, L. C. (2016). Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(4), 380-389.
- Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I. y Kaushik, P. (2021). Germplasm Conservation: Instrumental in Agricultural Biodiversity—A Review. *Sustainability*, 13(12), 6743.
- Quijada-Rivera, M. (2021). Estudio de la Regulación en la Expresión Génica en Embriones Cigóticos de Vid (*Vitis vinifera*) durante la Crioconservación. (Maestría en Ciencias), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, MX.
- Rahmah, S., Ahmad Mubbarakh, S., Soo Ping, K. y Subramaniam, S. (2015). Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities

of (*Brassidium*) Shooting Star Orchid. *The Scientific World Journal*, 2015, 961793.

- Raju, R., Bryant, S. J., Wilkinson, B. L. y Bryant, G. (2021). The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(1), 129749.
- Ren, L., Zhang, D., Chen, G.-q., Reed, B. M., Shen, X.-h. y Chen, H.-y. (2015). Transcriptomic profiling revealed the regulatory mechanism of *Arabidopsis* seedlings response to oxidative stress from cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 34(12), 2161-2178.
- SAGARPA. (2017). Uva Mexicana. Ciudad de México, México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- Sakai, A., Kobayashi, S. y Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33.
- Sakai, A. y Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryo Letters*, 28(3), 151-172.
- Samiey, B. y Dargahi, M. R. (2010). Kinetics and thermodynamics of adsorption of congo red on cellulose. *Central European Journal of Chemistry*, 8(4), 906-912.
- Seo, J. H., Naing, A. H., Jeon, S. M. y Kim, C. K. (2018). Anti-freezing-protein type III strongly influences the expression of relevant genes in cryopreserved potato shoot tips. *Plant Molecular Biology*, 97(4), 347-355.
- SIAP. (2022). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México, México: Producción de uva en México 2022. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/documentos/produccion-de-uva-en-mexico-2022>
- Simão, M. J., Collin, M., Garcia, R. O., Mansur, E., Pacheco, G. y Engelmann, F. (2018). Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique. *Protoplasma*, 255(3), 741-750.
- Sridharan, G. y Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16(2), 251-255.
- Thakur, A. K., Saharan, V. K. y Gupta, R. K. (2010). Drying of 'Perlette' grape under different physical treatment for raisin making. *Journal of food science and technology*, 47(6), 626-631.
- Tsai, S.-F., Yeh, S.-D., Chan, C.-F. y Liaw, S.-I. (2009). High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(2), 157-164.
- Ugbede, E. y Hamadina, E. (2018). 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(2), 98-103.
- Walters, C., Wesley-Smith, J., Crane, J., Hill, L. M., Chmielarz, P., Pammenter, N. W. y Berjak, P. (2008). Cryopreservation of Recalcitrant (i.e. Desiccation-Sensitive) Seeds. en B. M. Reed (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* (pp. 465-484). New York, NY: Springer New York.

- Vázquez-Yanes, C. y Toledo, J. R. (1989). Seed stage and conservation of plant species. *Botanical Sciences*, (49), 61-69.
- Volk, G. M., Bonnart, R., Shepherd, A., Yin, Z., Lee, R., Polek, M. y Krueger, R. (2017). Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2), 327-334.
- Wan, C. Y. y Wilkins, T. A. (1994). A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223(1), 7-12.
- Wang, L., Gao, Y., Wang, S., Zhang, Q. y Yang, S. (2021). Genome-wide identification of PME genes, evolution and expression analyses in soybean (*Glycine max* L.). *BMC Plant Biology*, 21(1), 578.
- Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C.-T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. y Perl, A. (2004). Cryopreservation of Grapevine (*Vitis spp.*) Embryogenic Cell Suspensions by Encapsulation–Vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(3).
- Wang, Y., Ji, S., Dai, H., Kong, X., Hao, J., Wang, S., Zhou, X., Zhao, Y., Wei, B., Cheng, S. y Zhou, Q. (2019). Changes in Membrane Lipid Metabolism Accompany Pitting in Blueberry During Refrigeration and Subsequent Storage at Room Temperature. *Frontiers in plant science*, 10(829).
- Wang, Z. C. y Deng, X. X. (2004). Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryo Letters*, 25(1), 43-50.
- Whiteley, S. E., Bunn, E., Menon, A., Mancera, R. L. y Turner, S. R. (2016). Ex situ conservation of the endangered species *Androcalva peralaria* (Malvaceae) by micropropagation and cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125(2), 341-352.
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C. y Fay, M. F. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany*, 91(1), 65-74.
- Zakaria, S., Subramaniam, S., Mubbarakh, S. A. y James Antony, J. J. (2020). Effect of Encapsulation-Dehydration Cryopreservation on Histological Analysis of *Oncidium* Golden Anniversary orchid PLBs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 596, 012082.
- Zeng, Y., Himmel, M. E. y Ding, S.-Y. (2017). Visualizing chemical functionality in plant cell walls. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 263.
- Zhang, J. F., Xu, Y. Q., Dong, J. M., Peng, L. N., Feng, X., Wang, X., Li, F., Miao, Y., Yao, S. K., Zhao, Q. Q., Feng, S. S., Hu, B. Z. y Li, F. L. (2018). Genome-wide identification of wheat (*Triticum aestivum*) expansins and expansin expression analysis in cold-tolerant and cold-sensitive wheat cultivars. *PLOS ONE*, 13(3), e0195138.
- Zhu, G.-Y., Geuns, J. M. C., Dussert, S., Swennen, R. y Panis, B. (2006). Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 80-94.