



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

**CRIOCONSERVACIÓN Y SU EFECTO SOBRE EL
GENOMA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN VID (*Vitis
vinifera* L.) CV. FLAME**

por:

Maria Fernanda Lazo Javalera

TESIS APROBADA POR LA

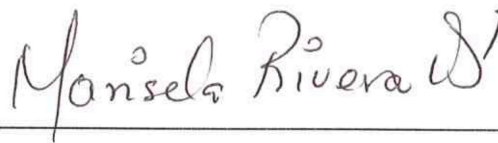
COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Maria Fernanda Lazo Javalera, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Marisela Rivera Domínguez

Director de Tesis



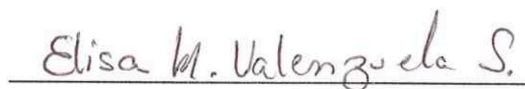
Dr. Martin Ernesto Tiznado Hernández

Asesor



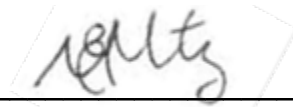
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro

Asesor

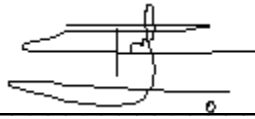


Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto

Asesor



Dr. Marcos Edel Martínez Montero
Asesor



Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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 del autor, 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 del Director General del CIAD.

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



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó para la realización de este trabajo, además por la aceptación y financiamiento del mismo.

A CIAD por brindarme la oportunidad de la realización de mis estudios de posgrado.

A mi asesora, Dra. Marisela Rivera Domínguez por su apoyo, consejos y paciencia en la realización de esta investigación.

A mi comité de tesis, Dr. Martin Tiznado, Dra. Irasema Vargas y Dra. Elisa Valenzuela por sus consejos, apoyo y accesibilidad en la realización de este trabajo.

A mis asesores foráneos, Dr. Marcos Martínez y Dra. Ma. del Carmen Rocha por aceptar ser parte de este proyecto y enriquecerlo.

A la Q.B. Karen Astorga, por su apoyo técnico brindado en la realización de gran parte de esta investigación, y por su amistad.

A la Q.A. Martina Contreras, por su apoyo técnico en la extracción de yemas de vid y en el análisis de malondiáldehido; gracias por tu amistad y por las pláticas interminables.

Al MC. Javier Ojeda por el apoyo técnico, la ayuda brindada y la confianza de abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Q.B. Socorro Vallejo, por su ayuda, apoyo técnico y accesibilidad en utilización del equipo de su laboratorio.

Al laboratorio de la Dra. Verónica Mata por permitirme la utilización del fotodocumentador.

A todos mis compañeros de generación por todo su apoyo moral, en especial a Eduardo Hernández y David Hurtado por hacer más amenas las clases y gracias por su amistad.

DEDICATORIA

A mi madre, Francisca Lazo que amo tanto, sin usted no sería lo que soy ahora, por enseñarme a superarme y alcanzar mis sueños siempre, sin duda un pilar en mi formación y mi ejemplo a seguir.

A mi abuela, Elvira Javalera mi segunda madre, por cuidarme y quererme tanto, definitivamente sin usted no habría llegado hasta aquí, la amo mucho.

A mis tías: Mary, Rosa, Guadalupe y Dora, por brindarme siempre su apoyo incondicional y sobre todo mucho cariño, sin duda mis terceras mamas, las quiero mucho.

A mi novio, Edgar Jiménez por siempre apoyarme en el cumplimiento de mis metas, muchas gracias por tus consejos y cariño, te amo.

A mis amigas por el cariño y amistad que siempre me brindan, en especial a Olivia Cabanillas por todos sus consejos y apoyo en esta etapa de mi vida.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	5
II.I. Clasificación y principales cultivares de vid.....	5
II.II. Importancia agronómica y producción.....	6
II.III. Conservación de vid.....	7
II.IV. Métodos de conservación de germoplasma.....	7
II.IV.I. Conservación <i>In situ</i>	8
II.IV.II. Conservación <i>Ex situ</i>	8
II.V. Crioconservación.....	9
II.VI. Técnicas de crioconservación.....	10
II.VI.I. Enfriamiento en dos pasos	12
II.VI.II. Método de desecación con flujo de aire	12
II.VI.III. Encapsulación-deshidratación.....	13
II.VI.IV. Encapsulación-vitrificación.....	14
II.VI.V. Vitrificación.....	15
II.VII. Crioconservación de vid.....	16
II.VIII Aspectos fisiológicos y moleculares de la crioconservación.	18
II.VIII.I. Estrés oxidativo.....	18
II.VIII.II. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	19
II.VIII.III. Peroxidación lipídica.....	21
II.VIII.IV. Malondialdehído.....	22
II.IX. Sistemas antioxidantes en plantas.....	23
II.IX.I. Superóxido dismutasa.....	23

CONTENIDO (continuación)

	Página
II.IX.II. Catalasa.....	24
II.X. Variabilidad genética.....	26
II.XI. Técnicas de detección de cambios genéticos en plantas crioconservadas.....	27
II.XI.I. Isoenzimas.....	28
II.XI.II. RFLP.....	28
II.XI.III. Microsatélites o secuencias de repetición simples (SSR).....	29
II.XI.IV. AFLP.....	30
II.XI.V. RAPD.....	31
III. HIPÓTESIS.....	34
IV. OBJETIVOS.....	35
IV.I. Objetivo general.....	35
IV.II. Objetivos específicos.....	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
V.I. Material vegetal.....	36
V.II. Ensayo de viabilidad	36
V.III. Análisis de viabilidad.....	37
V.IV. Crioconservación (Inmersión directa en NL).....	38
V.V. Vitrificación.....	38
V.VI. Peroxidación lipídica.....	39
V.VII. Extracción enzimática.....	40
V.VIII. Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	41
V.IX. Actividad de catalasa (CAT).....	42
V.X. Proteína total.....	43
V.XI. Aislamiento del ADN genómico.....	43
V.XII. Análisis de RAPD.....	44

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.XIII. Diseño experimental y análisis de datos.....	45
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
VI.I. Ensayo de viabilidad.....	46
VI.II. Proteína total.....	49
VI.III. Actividad enzimática SOD y CAT.....	53
VI.IV. Peroxidación lipídica.....	59
VI.V. Variabilidad genética.....	62
VII. CONCLUSIÓN.....	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Variedades de vid cultivadas en el municipio de Hermosillo, Sonora, México.....	6
2	Ecuaciones químicas de la formación de especies reactivas de oxígeno.....	20
3	Ecuación química de catálisis de la enzima superóxido dismutasa.....	24
4	Ecuaciones químicas de catálisis del peróxido de hidrógeno, a) catalasa y b) peroxidasa.....	24
5	Efecto del tiempo de incubación en PVS2 sobre el porcentaje de viabilidad en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless”.....	47
6	Efecto de la vitrificación y crioconservación por diferentes tiempos en nitrógeno líquido sobre la cantidad de proteínas totales en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless”.....	51
7	Efecto de la vitrificación y crioconservación por diferentes tiempos en nitrógeno líquido y con descongelamiento a 38°C por 3 min sobre la cantidad de proteínas totales en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless”.....	52
8	Actividad enzimática de catalasa (U/mg proteína) en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” crioconservadas.....	54
9	Actividad de catalasa (U/mg proteína) en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” sometidas a vitrificación.....	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Actividad enzimática superóxido dismutasa (U/mg proteína) en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” crioconservadas.....	57
11	Actividad de superóxido dismutasa (SOD) (U/mg proteína) en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” vitrificadas.....	58
12	Cantidad de malondialdehído ($\mu\text{mol.gr}^{-1}$ peso fresco) en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) crioconservadas y vitrificadas a diferentes tiempos en nitrógeno líquido.....	60
13	ADN genómico de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) tanto vitrificadas como crioconservadas, sin descongelarlas y descongeladas a 38°C/3 min.....	62
14	Amplificación mediante RAPD de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) vitrificadas (V) y crioconservadas (C). Amplificadas con el iniciador OPE-03.....	64
15	Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) vitrificadas (V), crioconservadas (C) y descongeladas a 38°C por 3min (M4). Amplificadas con el iniciador OPE-03.....	66
16	Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” vitrificadas (V) y crioconservadas (C). Amplificadas con el cebador OPE-15.....	68
17	Amplificación mediante RAPD de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) vitrificadas (V), crioconservadas (C) y descongeladas a 38°C por 3 minutos (M4). Amplificadas con el cebador OPE-15.....	69

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Efecto de la descongelación en la cantidad de proteína total en yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless” bajo diferentes tratamientos.....	53
2	Concentración de ADNg ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de las diferentes muestras (1-20) de yemas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) crioconservadas y vitrificadas utilizadas en el ensayo de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD).....	63
3	Fragmentos polimórficos en vid crioconservada (C) y vitrificada-crioconservada (V) (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless”.....	71
4	Fragmentos polimórficos en vid crioconservada (C) y vitrificada-crioconservada (V) (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv “Flame seedless”. Con la aplicación de descongelamiento a 38°C por 3 minutos.	71

RESUMEN

La vid es considerada uno de los cultivos más importantes económicamente en el mundo y en México. El estado de Sonora es líder en producción, por lo cual es importante conservar el germoplasma de las variedades utilizadas para el mercado de exportación. La criopreservación es una alternativa para el almacenamiento de tejidos vegetales por largos periodos en estado viable. Sin embargo, este método puede inducir estrés oxidativo causando daño celular e inducir alteraciones en el genoma. Debido a esto, en el presente trabajo se utilizó el método de criopreservación en yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.) cv "Flame seedless" para estudiar las alteraciones en el estado redox celular y en el genoma. Se realizó la estandarización de la incubación en la solución de vitrificación de plantas No. 2 (PVS2), variando el tiempo de exposición desde 0 hasta 180 min con intervalos de 30 min, posteriormente se almacenaron en NL por 1 h y se determinó su viabilidad. Las yemas fueron sometidas a criopreservación (inmersión directa en nitrógeno líquido (NL)) y a vitrificación con PVS2. Se almacenaron en NL por: tres segundos, 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes, posterior a cada tiempo fueron descongeladas a 38°C por 3 min. Se cuantificó el contenido de proteína total, concentración de malondialdehído (MDA), actividad enzimática de catalasa (CAT) y de superóxido dismutasa (SOD). Se evaluó la variabilidad genética mediante la técnica de análisis de polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD). El tiempo óptimo de incubación con PVS2 fue de 180 min observándose una viabilidad del 90%. La actividad de SOD y CAT en las yemas criopreservadas y vitrificadas fue menor respecto al control ($P < 0.05$), sin embargo, la actividad de ambas enzimas fue mayor en yemas criopreservadas respecto a las vitrificadas ($P < 0.05$), sugiriendo que la vitrificación redujo el nivel de estrés oxidativo en el tejido. El contenido de proteína total mostró diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos de criopreservación y vitrificación. El nivel de estrés oxidativo evaluado mediante MDA no mostró diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos de vitrificación y criopreservación, así como en la aplicación o no de calor en el

descongelamiento. Se detectaron alteraciones en el polimorfismo mediante RAPD por efecto de los tratamientos de crioconservación y del descongelamiento con calor respecto a los controles. El proceso de vitrificación indujo estrés oxidativo, sin embargo a nivel molecular no se detectaron cambios en la variabilidad genética, en contraste con lo registrado en yemas solo crioconservadas, por lo cual se concluye que la vitrificación protege la integridad del genoma en las yemas axilares de vid.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L., crioconservación, estrés oxidativo, RAPD, variabilidad genética, vitrificación.

ABSTRACT

The grapevine is considered one of the most economically important crops in the world and in Mexico. The state of Sonora is the leader of production, so it is important to conserve the germplasm of the grape varieties utilized in the export market. Cryopreservation is an alternative for the storage of plant tissues for long periods in a viable state. However, this method of preservation may induce oxidative stress causing cellular damage and induce alterations in the genome. Because of this, in the present work we used the method of cryopreservation in axillary buds of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv "Flame seedless" to study alterations in the cellular redox state and in the genome. Standardization was carried out by incubation in plant vitrification solution No. 2, called PVS2 varying the exposure time from 0 to 180 min with 30 min intervals, then stored for 1 hour in NL and their viability was determined. The buds were subjected to cryopreservation (direct immersion in liquid nitrogen (LN)) and vitrification with PVS2. The buds were stored in NL by: three seconds, 1 hour, 1 day, 1 week and 1 month, after each time were thawed at 38 °C for 3 min. It was quantified the total protein, malondialdehyde (MDA), enzymatic activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The effects on the genome were evaluated using the technique of analysis of random amplified polymorphic DNA called RAPD. The optimal incubation time with PVS2 was 180 min showing a viability of 90%. SOD and CAT activity in cryopreserved and vitrified buds was lower compared to the control ($P < 0.05$) however; the activity of both enzymes was higher in cryopreserved respect to vitrified buds ($P < 0.05$), suggesting that the vitrification reduced the level of oxidative stress in the tissue. The total protein content showed significant differences ($P < 0.05$) between treatments of cryopreservation and vitrification. The degree of peroxidation assessed by MDA showed no differences ($P > 0.05$) between treatments of cryopreservation and vitrification, as well as in the application or not of thawing. Alterations in polymorphism were detected by RAPD in the treatments of cryopreservation and thawing with heat compared to controls. The vitrification process induced oxidative stress,

however at molecular level no changes were detected in the genetic variability, in contrast to only cryopreserved buds, so it is concluded that vitrification protects the integrity of the genome in the axillary buds of grapevine.

Keywords: *Vitis vinifera* L., cryopreservation, genetic variability, oxidative stress, RAPD, vitrification.

I. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es considerada uno de los cultivos más importantes económicamente en el mundo (Wang *et al.*, 2004). Esto, debido a su explotación para la producción de vinos, para el consumo como fruta fresca y para la elaboración de jugos. A nivel nacional y sobre todo a nivel regional es de gran importancia, debido a que Sonora produce el 70% de la producción total de uva de mesa (SIAP, 2012), cultivando principalmente las variedades “Perlette”, “Flame”, “Superior” y “Redglobe”. Sin embargo, los cultivos de vid se ven constantemente alterados por la explotación y diversos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos, lo cual puede alterar la calidad y nivel de producción. Debido a esto, es importante buscar alternativas para la preservación del germoplasma de uva de donde depende el mercado de exportación de Sonora.

La conservación de especies requiere métodos *ex situ* eficientes y costo-efectivos para complementarlos con programas de preservación *in situ* (Touchell *et al.*, 2002). Sin embargo, esas técnicas de conservación no son muy eficientes para todas las especies debido a los efectos impredecibles de los factores bióticos y abióticos. La crioconservación es una alternativa relativamente nueva y muy eficiente para el almacenamiento de germoplasma. Esta técnica evita pérdidas de las especies de interés, así como daños o variaciones genotípicas en las plantas (Hirai y Sakai, 2000). Esto es ventajoso aunado a que es un método costo-efectivo y mantiene el material vegetal por largos periodos y sin alteraciones, en contraste con los métodos de cultivo *in vitro* o *ex situ* (Kaczmarczyk *et al.*, 2011).

Desde la aplicación inicial de la crioconservación en suspensiones celulares de zanahoria (Nag y Street, 1973) varias técnicas de crioconservación se han establecido para cientos de plantas (Benson, 1999; Towill y Bajaj, 2002). Una de las técnicas más novedosas es la vitrificación, en la cual los tejidos se ponen en contacto con soluciones crioprotectoras. Las soluciones vitrificantes más comúnmente usadas son las denominadas PVS2 (Sakai *et al.*, 1990,1991) y PVS3 (Nishizawa *et al.*, 1993), las cuales están compuestas de: dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, polietilenglicol (PEG) y sacarosa. En vid, la vitrificación mediante PVS2 se ha aplicado satisfactoriamente obteniendo viabilidades del 42 al 76% dependiendo del cultivar empleado (Wang *et al.*, 2004).

La crioconservación involucra condiciones de estrés que pueden resultar perjudiciales para algunos tejidos, como lo es la inducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Dionisio-Sese y Tobita, 1998). Las ERO pueden provocar daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos alterando así el metabolismo celular normal (Munns, 2002; Tammam *et al.*, 2008). No obstante, la célula cuenta con sistemas de defensa enzimáticos para enfrentar el estrés biótico (Hammond-Kosack y Jones, 1996) y abiótico como lo es la inducción de enzimas antioxidantes que estabilizan a las ERO para evitar daño en los tejidos (Hernández *et al.*, 1995; Burdon *et al.*, 1996; Fadzilla *et al.*, 1997).

Dentro de los principales mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos se encuentra la acción de superóxido dismutasa (SOD) la cual cataliza la conversión de $2O^{-2} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (McCord y Fridovich, 1969) y es considerada la defensa primaria contra los radicales de oxígeno (Bannister *et al.*, 1987). Por otro lado, se encuentra la enzima catalasa (CAT) que es un eficiente neutralizador de peróxido de hidrógeno ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (Aebi, 1987). Ambas son las principales enzimas antioxidantes, debido a que

neutralizan a las ERO de mayor incidencia en los tejidos bajo estrés. La neutralización de las ERO permite a la célula sobrevivir a condiciones de estrés.

Cuando se pierde el balance natural, el aumento de las ERO puede provocar daños celulares. La evidencia sugiere que las membranas son los sitios primarios de ataque de las ERO, las cuales reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados provocando su peroxidación (Esfandiari *et al.*, 2007), lo cual provoca la acumulación de malondialdehído (MDA) como producto final de peroxidación lipídica (Leshem, 1987). Debido a esto, el MDA es considerado como un marcador de tolerancia al congelamiento (Jouve *et al.*, 1993; Alonso *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 1998). El comportamiento de las membranas bajo condiciones de estrés ambiental, se ha reportado en gran medida en diversos tejidos, mostrando la susceptibilidad frente a las ERO (Kuiper, 1985; Thi *et al.*, 1989; Ramalho *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999). Sin embargo, la evaluación de los productos de oxidación no ha sido estudiada en la crioconservación y solo se conoce un trabajo publicado al respecto. Lynch *et al.* (2011) evaluaron los cambios en MDA en embriones de olivo y no encontraron cambios en la cantidad de MDA producido entre los diferentes pre-tratamientos osmóticos aplicados y después de la crioconservación.

Las ERO pueden provocar también alteraciones genéticas en los tejidos (Benson y Bremner, 2004), por lo cual, es recomendable evaluar a nivel genómico los tejidos después del proceso de crioconservación. En años recientes, los marcadores moleculares han sido una herramienta para estudios genéticos. Tal es el caso de la técnica molecular de análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés (Random Amplified Polymorphic DNA) la cual presenta ciertas ventajas como: bajo costo, requieren cantidades pequeñas de ADN genómico, rápida, simple, no se requiere conocimiento previo de la secuencia del genoma y es efectiva para evaluar la estabilidad genética en diversos tejidos de plantas (Nair y Reghunath, 2009).

Esta técnica se ha utilizado anteriormente en análisis de relaciones filogenéticas en diversas plantas, tal como manzana (Royo e Itoiz, 2004), sorgo (Singh *et al.*, 2006) y vid (Benjak *et al.*, 2005; Kocsis *et al.*, 2005; Karataş y Ağaoğlu, 2008; Maia *et al.*, 2009). En el análisis genómico de plantas crioconservadas mediante RAPD, no se ha detectado variaciones en las plantas crioconservadas de *Dioscorea floribunda*, *Solanum tuberosum* L., y *Anigozanthos viridis* (Ahuja *et al.*, 2002; Hirai y Sakai, 1999; Turner *et al.*, 2001b). En el caso particular de vid, Zhai *et al.* (2003) no detectaron variaciones genéticas en plantas crioconservadas utilizando siete iniciadores mediante RAPD. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en lo referente a variaciones genéticas y bioquímicas en vid crioconservada, es por ello que en este trabajo se evaluó el método de crioconservación y vitrificación, mediante el análisis de: peroxidación lipídica, cantidad de proteína, actividad enzimática de SOD y CAT; y la variabilidad genética mediante RAPD en yemas axilares de vid.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Clasificación y Principales Cultivares de Vid

La vid se clasifica dentro de la familia *Vitaceae* del género *Vitis*, el cual incluye dos subgéneros: *Euvitis* (38 cromosomas) y *Muscadinia* (40 cromosomas), dentro de los cuales se encuentra una amplia variedad de especies. *Euvitis* se divide a su vez en varios géneros (Hidalgo, 1999) siendo en la familia *Viniferae* donde se encuentra la especie *Vitis vinifera* L. que se produce en mayor proporción (90%) en el mundo, debido a su importancia económica por su uso industrial y alimenticio (Salunke y Kadam, 1995).

Durante el proceso de domesticación la uva ha sido sometida a cambios para su mejoramiento, y así obtener variedades con mayor contenido de azúcar, bayas de mayor tamaño, sin semillas, de cosecha temprana, mayor rendimiento y una producción más regular, principalmente. En este proceso, los cambios en el tamaño del fruto y pasar del uso de plantas silvestres a hermafroditas fue crucial (Terral, 2002), surgiendo así alrededor de 5000 variedades de *Vitis vinifera*. Por ello, existen diversas variedades de vid alrededor del mundo y aun cuando son fenotípicamente muy similares reciben gran diversidad de nombres dependiendo de la región de origen (Bowers *et al.*, 1999).

Según la asociación agrícola local de productores de uva de mesa las zonas productoras de vid en el municipio de Hermosillo, Sonora, México actualmente cultivan las variedades: “Perlette”, “Flame”, “Sugraone” y “Redglobe”, principalmente (Fig. 1). “Perlette” es la primera uva de la temporada, de bayas redondas sin semilla y de color blanco cristalino con una textura crujiente de

sabor suave y dulce. La variedad “Flame” es la más popular por su forma redonda sin semilla, de color rojo con textura crujiente y fuerte sabor dulce. “Sugraone” tiene bayas grandes y alargadas sin semilla, de color verde claro y racimos abundantes de textura crujiente y un sabor dulce. Por último, la variedad “Redglobe” que es una variedad de gran tamaño, de color rojo oscuro, cáscara firme y cuerpo tierno de semillas grandes (AALPUM, 2012).

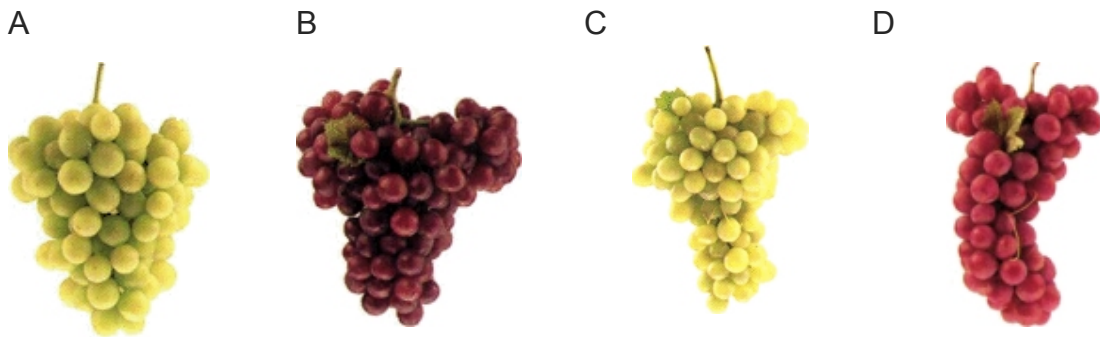


Figura 1. Variedades de vid cultivadas en el municipio de Hermosillo, Sonora, México. A) Perlette, B) Flame, C) Sugraone y D) Red Globe (AALPUM, 2012).

Importancia Agronómica y Producción

La vid se cultiva entre los 30 y 50 grados de latitud en ambos hemisferios. Los principales países viticultores son: China, Italia, Estados Unidos de América, España, Francia, México, Chile y Argentina (FAOSTAT, 2012). En México existen tres regiones productoras: la zona norte (Baja California y Sonora), la zona de la Laguna (Coahuila y Durango) y la zona centro (Zacatecas, Aguascalientes y Querétaro), actualmente la producción de uva en dichas zonas tienen tres destinos principales en México: uva de mesa, uva pasa y la que se destina para la industria (SIAP, 2012).

El total de área sembrada de vid en México en el 2012 fue de 28,675 ha. En el mismo año el estado con mayor superficie tanto sembrada como cosechada fue Sonora con 19,870 ha (69% de la producción nacional), seguido de Baja California con 3,595 ha (13%), Zacatecas con 3,590 ha (13%), Aguascalientes con 843 ha (3%) y Coahuila con 305 ha (1%) (SIAP, 2012). Es por esto muy importante implementar metodologías para conservar las uvas de interés para México y sobre todo para Sonora que encabeza el listado en la producción de uva.

Conservación de Vid

La región de La Costa de Hermosillo, es el principal productor de uva de mesa en México; sin embargo, el estado de Sonora no cuenta con un sistema de conservación idóneo de vid. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la costa de Hermosillo, Sonora maneja un pequeño banco de germoplasma donde propagan la vid de manera rústica, por estacas. En dichas condiciones de campo se tiene como limitante que se necesitan grandes extensiones de tierra, los costos por mantenimientos asociados a las labores agrotécnicas son altos, se hace necesario controlar plagas y enfermedades, aunado a que las plantas son vulnerables a los desastres climáticos. Por ello, es importante el desarrollo de nuevas técnicas de conservación adecuadas para cada especie, lo que permite la conservación adecuada de los recursos genéticos importantes.

Métodos de Conservación de Germoplasma

A lo largo de los años, se han desarrollado diversas técnicas para la conservación de germoplasma vegetal con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola. La conservación de recursos

genéticos se apoya principalmente mediante el uso de las estrategias *in situ* y *ex situ* (Jaramillo y Baena, 2000).

Conservación *In Situ*

En la conservación *in situ* las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas protegidas (García-Águila *et al.*, 2007).

Conservación *Ex Situ*

En la conservación *ex situ* las especies se preservan fuera de su hábitat natural, en bancos de plantas en campo, bancos de plantas *in vitro* y los bancos de semillas botánicas (García-Águila *et al.*, 2007). Estos últimos almacenan las plantas que producen semillas ortodoxas, que les permita ser almacenadas a largo plazo con bajos contenidos de humedad y a bajas temperaturas. Sin embargo, no todas las especies pueden ser conservadas de esa manera, dado que algunas son de propagación vegetativa y otras producen semillas con un comportamiento no ortodoxo, por lo que no toleran las condiciones de almacenamiento de los bancos de germoplasma (Berjak y Pammenter, 2002).

Dichas plantas susceptibles han dado como resultado la existencia de grandes brechas en la cobertura taxonómica y geográfica de muchas colecciones *ex situ*, fundamentalmente de especies silvestres. En estos casos, la diversidad genética de estas especies se puede conservar con técnicas de conservación *in vitro* (Graudal *et al.*, 1997). Dentro de las técnicas de conservación del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se encuentran las de conservación a corto, mediano y largo plazo. La metodología a largo plazo que ha tenido prometedores resultados, es la crioconservación.

Crioconservación

La crioconservación consiste en el almacenamiento de material biológico en nitrógeno líquido a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Helliot y Boucaud, 1997) sin pérdida de su viabilidad y sin altos costos de mantenimiento. Así, en cualquier momento, el material vegetal puede ser fácilmente recuperado y reiniciar el establecimiento de las líneas clonales deseadas (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). Durante la crioconservación se detiene la división celular, el metabolismo y los procesos bioquímicos, por lo tanto, el material vegetal puede ser almacenado sin deterioro por un largo periodo (Zhu *et al.*, 2006).

La crioconservación en nitrógeno líquido, ha sido aplicada para más de 200 especies de plantas diferentes cultivadas de diversas maneras, incluyendo suspensiones celulares, callos, ápices, polen, embriones somáticos y cigóticos (Baek *et al.*, 2003; Martínez-Montero *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2005; Reed, 2008) aplicando diversos tratamientos previos, para obtener mejores resultados para cada especie. Es por ello, que este método es una valiosa herramienta de conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos, tanto de especies susceptibles como aquellas con semillas recalcitrantes, especies que se propagan vegetativamente o simplemente para la conservación de cualquier material con un bajo costo de mantenimiento.

Comparada con el cultivo *in vitro*, la crioconservación presenta ventajas muy favorables, debido a que, el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección resulta ser mucho menor, el costo para labores y mantenimiento es mínimo (solamente el llenado continuo del tanque) y, una vez almacenadas las muestras, estas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos de regeneración y los riesgos de contaminación de los tejidos (Villalobos y Engelmann, 1995). Muchos de los bancos de germoplasma que existen carecen de suficiente capacidad para albergar un gran número de muestras, por lo que no es posible salvaguardar gran parte de

la biodiversidad. Ese hecho, hace que la crioconservación se profile como una solución a los desafíos de la conservación a largo plazo de las especies vegetales (Abdelnour, 1999), no sólo de plantas importantes en la alimentación, sino también las de interés agronómico y cultural.

Para un proceso de crioconservación exitoso, es importante la selección del estado fisiológico óptimo en el cual los explantes puedan ser utilizados para el congelamiento (Wu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999). Se debe evitar principalmente la formación de cristales de hielo dentro de las células durante la congelación-descongelación para impedir la muerte del tejido. Los daños pueden ser prevenidos mediante la utilización de varios pre-tratamientos incluyendo aclimatación al frío, exposición con ácido abscísico (ABA), inmersión en soluciones concentradas de azúcar y la deshidratación (Ashmore, 1997; Shibli, 2000; Shibli *et al.*, 1999).

Teniendo en consideración lo anterior, es notable que para realizar cualquier técnica de crioconservación es necesario estandarizar la metodología. Se han desarrollado muchos procedimientos de crioconservación de germoplasma debido a que no existe un protocolo óptimo para todas las especies (Engelmann *et al.*, 1995; Pennycooke y Towill, 2000; Matsumoto y Sakai, 2003; Nieves *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2009). Las principales técnicas utilizadas son la encapsulación-deshidratación y la vitrificación, o bien la combinación de ellas (Reed, 1990). Por ello, es importante conocer cada una de las técnicas y adecuarlas a cada una de las especies de interés y establecer sus condiciones óptimas de manejo.

Técnicas de Crioconservación

La crioconservación de tejidos vegetales es una disciplina relativamente nueva, y a partir de la década de los 90 comenzaron a utilizarse las nuevas técnicas de

crioconservación. El desarrollo de los nuevos protocolos basados en la técnica de vitrificación, consideran como punto crítico la deshidratación para lograr la supervivencia del tejido crioconservado (González-Arno y Engelmann, 2013). Los nuevos procedimientos son operativamente menos complejos que los clásicos y tienen mayor potencial para una aplicabilidad, pues solo requieren pequeñas modificaciones para los diferentes tipos de células (Engelmann, 1997) con potencial de regeneración. Sin embargo, las metodologías desarrolladas se han mejorado para una mayor regeneración y viabilidad de los tejidos tratados.

Hace cincuenta años inició la aplicación de la crioconservación en el material vegetal. Sakai (1960) demostró que ciertas yemas latentes podían resistir la inmersión directa en el nitrógeno líquido y fue en 1968 cuando se publicó el primer reporte sobre crioconservación de material vegetal *in vitro* (Quatrano 1968). Los tratamientos clásicos que inicialmente se empleaban consistían en un congelamiento gradual a temperaturas por debajo de 0°C en contraste con los nuevos procedimientos se basan en la deshidratación celular inducida. La remoción de la mayor parte o de toda el agua congelable de las células, se obtiene mediante el uso de soluciones altamente concentradas. Por consiguiente se pueden identificar siete procedimientos diferentes basados en la vitrificación: encapsulación-deshidratación, un procedimiento actualmente denominado vitrificación, encapsulación-vitrificación, deshidratación, precrecimiento, precrecimiento-vitrificación y gota-vitrificación (González-Arno y Engelmann, 2013). A continuación se mencionan las principales técnicas empleadas en la crioconservación tanto el método clásico como los nuevos tratamientos.

Enfriamiento en dos Pasos

Es uno de los primeros protocolos que se estableció, también llamado congelamiento lento. El tejido es tratado previamente y enfriado lentamente a una velocidad controlada (0.1 - 4 °C/min) hasta -40°C, seguido de una rápida congelación en nitrógeno líquido (Ashmore, 1997). El ajuste de la velocidad y temperatura de pre-congelación permite la modificación de la cantidad de agua intracelular y por lo tanto reduce el daño causado por la cristalización del agua (Villalobos y Engelmann, 1995). Sin embargo esta técnica implica invertir mucho tiempo y es muy compleja. Se requiere del uso de aparatos muy costosos para disminuir gradualmente la temperatura, mediante la cual se pueden formar cristales y lisar las células, lo que conlleva a una baja tasa de supervivencia de los explantes (Lipavska y Vreugdenhil, 1996; Sakai *et al.*, 1990).

En general, los rangos de congelamiento lento producen mayores valores de supervivencia (Chang y Reed, 2000). Este método clásico de congelamiento lento ha sido aplicado satisfactoriamente en cultivos de-diferenciados como suspensiones celulares y callos (Kartha y Engelmann, 1994). En el caso de vid no hay reportes utilizando esta técnica, pero en tabaco la crioconservación mediante esta técnica fue menos efectiva comparada con el método de vitrificación (Kobayashi *et al.*, 2006). En papa aumentó la sobrevivencia utilizando la congelación lenta comparada con la vitrificación (Zhao *et al.*, 2005). Pero para cada tejido los porcentajes de sobrevivencia dependen de la planta, su estado fisiológico y de la fuente de explante.

Método de Deseccación con Flujo de Aire

Este protocolo es el más simple de todos, donde el tejido a conservar es secado inicialmente con un flujo de aire estéril bajo una campana de flujo laminar para

posteriormente congelarlo en nitrógeno líquido. Es uno de los primeros métodos desarrollados y cuenta con la desventaja de que no hay un control de temperatura ni de humedad del aire, aunque actualmente se utiliza sílica gel (Panis *et al.*, 2001). La utilización de sílica gel se ha empleado en plantas de interés agronómico usando embriones cigóticos y granos de polen principalmente (Uragami *et al.*, 1990; Engelmann, 2004).

La desecación provoca en los explantes cambios en la concentración de electrolitos aumentando el pH citoplasmático y la desnaturalización de proteínas (Dumet y Benson, 2000). Por lo tanto este método es muy utilizado para plantas con semillas ortodoxas o resistentes, ya que presentan tolerancia a contenidos de humedad de hasta el 3% sin presentar daño o pérdida de viabilidad (Uragami *et al.*, 1990; Panis *et al.*, 2001; Engelmann, 2004). La desventaja de este método de crioconservación es para las especies que no son resistentes y que no pueden conservarse bajo estas condiciones ya que presentan baja o nula sobrevivencia.

Encapsulación-Deshidratación

Esta técnica, fue establecida por Dereuddre *et al.* (1990) usando meristemos de plantas de pera *in vitro*; la cual fue basada en la producción de semillas sintéticas, donde embriones somáticos se encapsularon en gel hidrosoluble. Esta técnica se basa principalmente en una deshidratación osmótica sucesiva y evaporación de las células vegetales (Swan *et al.*, 1999). Mediante esta técnica el material vegetal es encapsulado formando perlas con alginato de calcio, seguido de un pre-cultivo en un medio que contiene alta concentración de sacarosa (Lipavska y Vreugdenhil, 1996; Shatnawi *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 1998). Las cápsulas posteriormente son deshidratadas usando aire en una campana de flujo laminar o bien utilizando sílica gel, para proceder a congelarlas en nitrógeno líquido (Ashmore, 1997). Dicha técnica disminuye la

vulnerabilidad de los explantes al ser sometidos a tratamientos muy drásticos como pre-tratamientos con elevadas concentraciones de azúcares seguidos por una intensa deshidratación (Cho *et al.*, 2002).

Las concentraciones y porcentajes de humedad final van a variar dependiendo del género, especie y variedad, de ahí la importancia de una estandarización de estos procesos. En el caso del cultivo de uva, Wang *et al.* (2002) obtuvieron una viabilidad de 78% utilizando encapsulación-deshidratación. De igual forma la presencia de la matriz nutritiva (cápsula) rodeando al explante puede promover su regeneración después de la descongelación. Es un método simple utilizado en muchas especies vegetales, sin embargo, no todas las especies son tolerantes a la concentración alta de sacarosa que se utiliza en esta técnica (Shibli, 2000).

Encapsulación-Vitrificación

La técnica de encapsulación-vitrificación es una combinación del método de encapsulación-deshidratación y vitrificación. El tejido vegetal es encapsulado para formar perlas con el alginato de calcio para posteriormente congelarlas por vitrificación (Lipavska y Vreugdenhil, 1996). Este método es de fácil manejo y ahorra el tiempo que toma la deshidratación en otros procesos de crioconservación, por lo que su utilización ha ido en aumento (Hirai *et al.*, 1998).

La utilización de encapsulación-vitrificación se ha aplicado en pocas plantas pese a las ventajas de su aplicación. Hirai *et al.* (1998) encontraron una mayor formación de brotes en meristemas de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) osmoprotectidos con 2 M de glicerol mas 0.4 M de sacarosa. En el caso de clavel, los meristemas encapsulados e incubados con la solución de vitrificación (conteniendo etilenglicol y sacarosa), obtuvieron valores de sobrevivencia del 92 al 100% (Ashmore, 1997). De igual forma, es necesario conocer el tipo de

tejido para adaptarlo a cualquiera de las metodologías mencionadas y obtener un máximo de regeneración.

Vitrificación

Esta técnica se desarrolló desde hace 10 años y se ha aplicado en diferentes especies vegetales (Razdan y Cockling, 1997). La vitrificación es el principal método empleado en la crioconservación y puede definirse como la solidificación de un líquido sin la formación de cristales y con una extrema elevación en la viscosidad celular durante el congelamiento (Fahy *et al.*, 1984). La concentración de solutos provoca que se forme hielo amorfo sin cristales, lo que evita el daño físico a las membranas con lo que se logra una mayor integridad celular. Es un método fácil de realizar aunado a un alto porcentaje de regeneración de los explantes crioconservados y su adaptabilidad para usarse en muchos tejidos.

En el proceso de vitrificación se realizan varios pasos donde los tejidos son deshidratados con una alta concentración de osmolitos para evitar la formación de cristales (Moges *et al.*, 2003). El proceso consiste en tres fases: la fase de carga, donde las muestras se tratan con crioprotectores, la fase de deshidratación, con soluciones concentradas y la fase de descarga, un calentamiento rápido donde la solución de vitrificación es drenada y reemplazada con sacarosa a altas concentraciones (Ashmore, 1997). Un punto importante es la remoción progresiva de la solución vitrificante agregando medio líquido con sacarosa o sorbitol para diluir la solución y reducir el choque osmótico (Engelmann, 1997).

Las soluciones de vitrificación, son crio-protectores acuosos que permiten al explante congelarse lentamente sin la formación apreciable de hielo intra o extra celular (Fahy *et al.*, 1987). Los osmolitos que la constituyen interactúan

con las moléculas de agua evitando la formación de hielo. La solución aumenta el potencial osmótico del medio externo (Reed, 1995) y ayuda a que el agua fluya fuera de la célula. Por lo tanto las soluciones vitrificantes tienen la doble función de proteger a la célula de la formación de cristales y de la deshidratación (Lipavska y Vreugdenhil, 1996).

Los crioprotectores no deben ser tóxicos, deben ser de bajo peso molecular, miscibles con el agua y tener la habilidad de penetrar a las células (Reinhold *et al.*, 1995). Entre esos materiales los más usados son DMSO, glicerol, etilenglicol (EG), polietilenglicol (PEG), aminoácidos y azúcares (Al-Ababneh *et al.*, 2003). La mayoría de las soluciones empleadas se derivan de las elaboradas por Sakai *et al.* (1991), que contienen en general 22% glicerol, 15% etilenglicol, 15% polipropilenglicol, 7% DMSO y 0.5 M de sorbitol. Otra solución llamada PVS2 reportada por Benson (1994) contiene 30% glicerol, 15% DMSO, 15% etilenglicol disuelto en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 0.15 M de sacarosa.

Los primeros estudios sobre la crioconservación de plantas basada en la vitrificación fueron realizados por Uragami *et al.* (1989) con embriones somáticos de *Asparagus officinalis* L. y Langis *et al.* (1989) con suspensiones celulares de *Brassica campestris*. Desde entonces, la aplicación de esta estrategia ha permitido el almacenamiento de un elevado número de tejidos vegetales como células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakai *et al.*, 1990) y protoplastos de *Secale cereale* (Langis y Steponkus, 1991), meristemos de *Ananas comosus* (piña) (González *et al.*, 1998), yuca (Charoensub *et al.*, 1999), papa (Pennycooke y Towill, 2000) y *Anigozanthos humilis* (Turner *et al.*, 2001a).

Crioconservación de Vid

Se han desarrollado diversas formas de crioconservación en vid, debido a la utilización de una gran diversidad de tejidos, genotipos y de técnicas de

crioconservación. Uno de los explantes más utilizados son las suspensiones celulares, y el primer reporte fue publicado por Dussert *et al.*, (1991) quienes utilizaron la variedad “41B” obteniendo más del 60% de viabilidad de sus explantes, todo esto utilizando la técnica de enfriamiento en dos pasos. En suspensiones celulares del cultivar “Red Globe” mediante encapsulación-deshidratación, Wang *et al.* (2002) obtuvieron aproximadamente el 70% de viabilidad. Recientemente, Wang *et al.* (2004) crioconservaron células embriogénicas mediante encapsulación-vitrificación y obtuvieron viabilidades del 42 al 76%. Datos similares fueron obtenidos por González-Benito *et al.* (2009) donde utilizaron suspensiones celulares embriogénicas mediante encapsulación-deshidratación de los cultivares “Tempranillo” y “Albariño”, obteniendo viabilidades superiores al 50%.

Otro tipo de explante que ha sido utilizado son los brotes tanto apicales como axilares, Wang *et al.*, (2000) crioconservaron ápices de dos variedades de vid “LN33” y “Superior” utilizando encapsulación-deshidratación obteniendo 60% de sobrevivencia para ambos cultivares. De igual forma, Zhao *et al.* (2001), crioconservaron yemas axilares de vid mediante encapsulación-deshidratación obteniendo una regeneración del 15 al 40%. En 2003, Matsumoto y Sakai crioconservaron brotes axilares del cultivar “Cabernet Sauvignon” mediante vitrificación encontrando 60-80% de recuperación después de 1 hora en NL con un tiempo de 80 min en la solución PVS2. Zhai *et al.* (2003) crioconservaron vid cvs “Cabernet franc”, “Chardonnay”, “Fengh 51” y “LN33” no encontrando diferencias entre los tejidos crioconservados y los controles respecto a su estabilidad genética mediante RAPD; reportando en promedio un 36% de regeneración.

Ganino *et al.* (2012) crioconservaron ápices de vid cv “Kober 5BB” y analizaron la anatomía y el potencial osmótico de los brotes, encontraron que a los 30 min en PVS2 la regeneración disminuyó desde un 94 a 57 %. Como se puede observar en lo referente a la crioconservación de vid, no ha sido muy utilizada y los trabajos reportados se han enfocado en la optimización de los protocolos

para obtener una mayor regeneración y/o viabilidad, sin tomar en cuenta otros factores de importancia que es necesario analizar en los procesos de crioconservación, como es el estrés oxidativo celular y la variabilidad genética.

Aspectos Fisiológicos y Moleculares de la Crioconservación

Durante todo el proceso de crioconservación, el tejido es sometido a diversos tipos de estrés, como los cambios de temperaturas (altas y bajas), la formación de cristales de hielo, deshidratación, contacto con sustancias tóxicas y daños mecánicos, lo cual puede provocar daños celulares. En las plantas es bien sabido que los efectos tóxicos del estrés biótico y abiótico influyen en diversas formas como: decremento en la actividad fotosintética (Lim *et al.*, 2007), reducción en la absorción de agua y nutrientes, inhibición del crecimiento (Khalvati *et al.*, 2010; Gutha y Reddy, 2008), daño en proteínas (Mot *et al.*, 2007), cambios en la composición de lípidos (Novitskaya *et al.*, 2004) y la peroxidación lipídica (Shah *et al.*, 2001). Todos estos procesos pueden inducir la formación de radicales libres y un desacoplamiento metabólico.

Estrés Oxidativo

El estrés celular en los tejidos sometidos a crioconservación está asociado con el daño osmótico, desecación y el decremento de temperatura. La exposición a temperaturas bajo cero resulta en la formación de cristales de hielo, siendo la principal causa de daño mecánico en las células vegetales. El congelamiento *per se* o la deshidratación inducida por el congelamiento pueden causar la desnaturalización de proteínas y la alteración de complejos macromoleculares. Diversos tipos de estrés (sequías, bajas temperaturas, deshidratación, etc.) tienen un común denominador, el cual es la producción de especies reactivas

de oxígeno (ERO) los cuales pueden generar daños a las macromoléculas celulares.

Dentro de las ERO están los radicales superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, los cuales son formados como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno. La producción de ERO pueden causar daño al exceder la capacidad antioxidante celular. Debido a que estas moléculas tienen electrones impares que causan daño por la oxidación de macromoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (Halliwell y Whiteman, 2004).

Son muchas las consecuencias de la producción de las ERO, y no se han analizado aún a detalle en el proceso de crioconservación, para poder determinar el punto crítico donde ocurre su mayor producción. Sin embargo, un acoplamiento metabólico estable y una protección de antioxidantes eficiente, bajo condiciones fisiológicas normales para las células, aseguran que los daños por los radicales libres no ocurran (Dumet y Benson, 2000).

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las ERO son generadas tanto en la cadena de transporte de electrones como de fuentes enzimáticas, y su generación se incrementa por diversos tipos de estrés que incluyen: exceso de energía de luz, envejecimiento, ozono, sequía, radiación UV, ataque de patógenos, altas y bajas temperaturas y metales pesados (Dat *et al.*, 2000; Bray *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2002; Vranova *et al.*, 2002). La formación de las ERO durante la crioconservación se puede producir en varios tratamientos en los que los tejidos se ven involucrados, tales como: disección de los explantes, daño osmótico, desecación por los crioprotectores y los cambios rápidos de temperatura. (Benson y Bremner, 2004; Roach *et al.*, 2008).

Todos los componentes celulares son sitios posibles de producción del radical superóxido, pero los cloroplastos, mitocondria y peroxisomas son los mayores generadores de las ERO (Fridovich, 1986). El oxígeno es normalmente reducido por cuatro electrones para producir agua, una reacción catalizada por el complejo IV (citocromo oxidasa) en la cadena de transportes de electrones en la mitocondria. En los cloroplastos mediante la reacción de Mehler se genera el radical superóxido que luego es convertido en peróxido de hidrógeno (Polle, 1996). Sin embargo, el oxígeno molecular es también convertido a ERO por la reducción de un solo electrón para producir el anión superóxido (Ec. 1(Fig. 2)).

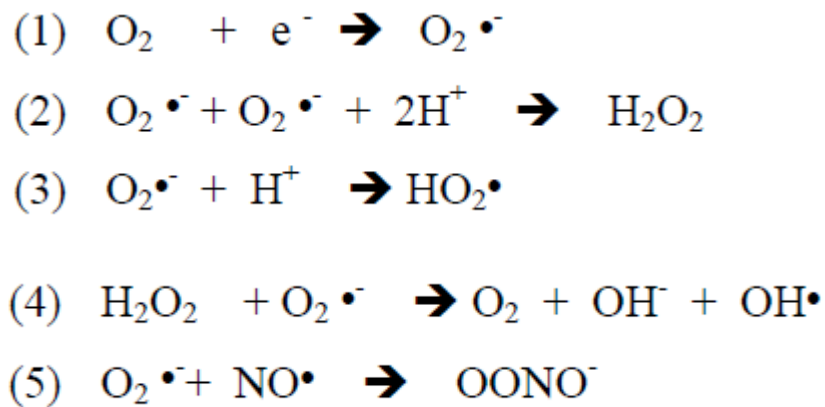


Figura 2. Ecuaciones químicas de la formación de especies reactivas de oxígeno.

En las reacciones anteriores (Fig. 2), se muestra que un electrón extra está sin par en el orbital exterior (Ec. 1), por lo que el anión superóxido es un radical libre. El anión superóxido es altamente inestable, convirtiéndose de nuevo en oxígeno molecular o en H₂O₂, siendo catalizado espontáneamente o bien catalizado por la enzima superóxido dismutasa (Ec. 2). El peróxido de hidrógeno es una molécula no cargada, puede difundirse a través de ambientes acuosos o lipídicos y tiene una vida media más larga que el radical superóxido. Sin embargo, puede protonarse para formar el radical perhidroxilo no cargado (Ec. 3).

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar entre ellos para generar el radical hidroxilo que es altamente reactivo, mediante la reacción de Haber-Weiss o Fenton, siguiendo la transición de iones de metales como fierro o cobre (Ec. 4). Otra reacción relevante es entre el radical superóxido y el óxido nítrico, para producir peroxinitrito (Ec. 5), el cual es muy reactivo y causa daño celular.

Peroxidación Lipídica

Las membranas celulares representan la mayor área donde puede ocurrir el daño debido a las bajas temperaturas, provocando pérdida de la compartimentalización celular, llevando a la muerte celular (Anchordoguy *et al.*, 1987, Dowgert y Steponkus, 1984; Gordon-Kamm y Steponkus, 1984; Lynch y Steponkus, 1987). Los radicales libres atacan la fracción lipídica de las membranas principalmente los ácidos grasos poliinsaturados, lo que trae como resultado la formación de los peróxidos de lípidos y éstos a su vez son inestables y forman productos tóxicos de la oxidación secundaria (Esterbauer *et al.*, 1989).

Los productos de la peroxidación lipídica son aldehídos los cuales son citotóxicos, entre los más dañinos se encuentran el malondialdehído (MDA) y el hidroxí-2-nonenal (Adams *et al.*, 1999). El MDA es una molécula sumamente reactiva y tóxica. Su unión con ácidos nucleicos y proteínas causan modificaciones que interrumpen las funciones biológicas (Del Río *et al.*, 2005; Esterbauer *et al.*, 1991; Yamauchi *et al.*, 2008). Por lo tanto, el grado de peroxidación de los lípidos puede ser estimado mediante la cantidad presente de MDA en los tejidos (Davey *et al.*, 2005; Esterbauer y Cheeseman, 1990).

Existen evidencias que sugieren la presencia de radicales libres mediados por estrés oxidativo durante la aplicación de protocolos de crioconservación, desecación y manipulación en el cultivo de tejidos (Benson, 1990). Esto se

ejemplifica por la detección indirecta (Benson y Noronha-Dutra, 1988) y directa (Magill *et al.*, 1994) de los radicales libres en células vegetales que han sufrido tratamientos de descongelación, crioconservación y desecación. También, se han detectado productos de peroxidación lipídica secundaria en suspensiones celulares (Benson *et al.*, 1995) y en tejidos estresados por el cultivo *in vitro* (Robertson *et al.*, 1995).

Malondiáldehido (MDA)

El MDA es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, producido por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Janero, 1990). Puede reaccionar con varios grupos funcionales o moléculas incluyendo proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Sevilla *et al.*, 1997). Como se mencionó anteriormente, el MDA puede causar daño celular en plantas y animales, por lo tanto su determinación es un indicador del estrés oxidativo en células y tejidos (Yagi, 1998; Armstrong y Browne, 1994). En plantas una técnica muy empleada para cuantificar la concentración de MDA es utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta técnica se basa en la reacción de MDA con el TBA para formar un pigmento rosa, que es la condensación de TBA-MDA en una razón molar 2:1, presentando una absorción máxima a los 532 nm (Nair y Turner, 1984).

Otro aspecto importante, el cual no ha sido estudiado a fondo, es la relación entre el ADN y MDA. Se ha visto que MDA puede interactuar con proteínas y el ADN, causando pérdida de la función en proteínas y mutaciones en el ADN (Halliwell y Gutteridge, 2007; Hipkiss *et al.*, 1997; Marnette, 1999). Algunos reportes mencionan que el MDA reacciona con las bases del ADN para formar una serie de aductos como pirimidinona, desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina (Marnette, 1994). La pirimidinona posee una región de apareamiento de bases de Watson-Crick bloqueado que ha demostrado ser mutagénico (Marnette, 1999). Por lo tanto, la reparación eficiente de los aductos

formados por el MDA es esencial para conservar la estabilidad genómica (Cline *et al.*, 2004).

Sistemas Antioxidantes en Plantas

Un antioxidante puede ser definido como cualquier molécula que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo a una molécula (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las ERO pueden ser removidos por vías enzimáticas y no enzimáticas. Los antioxidantes celulares evitan que las ERO causen daño en los tejidos. La síntesis continua de las especies reactivas de oxígeno en el metabolismo sería incompatible con la viabilidad si no existieran los sistemas antioxidantes capaces de mantener bajas concentraciones intracelulares de las ERO. Dentro de los mecanismos antioxidantes no enzimáticos se incluye a la vitamina C (ascorbato), vitamina E (tocoferol), glutatión que es uno de los mayores antioxidantes en plantas (Kranter *et al.*, 2006), flavonoides, alcaloides y carotenoides (Bray *et al.*, 2000). Los antioxidantes enzimáticos más caracterizados son la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

Superóxido Dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) constituye la primer línea de defensa contra el estrés oxidativo, cataliza la conversión de anión superóxido (O_2^-) a peróxido de oxígeno (H_2O_2) (Fridovich, 1983) (Fig. 3). Las SOD's se clasifican en tres grupos, basándose en el metal cofactor usado por la enzima: SOD de hierro (Fe-SOD), SOD de manganeso (Mn-SOD) ambos tipos son estructuralmente similares y por último está la SOD de Cobre más Zinc (CuZn-SOD) la cual no se relaciona estructuralmente con las otras dos. Las tres se encuentran localizadas en diferentes compartimentos celulares en plantas

superiores: La Fe-SOD se localiza en los cloroplastos, Mn-SOD en la mitocondria y los peroxisomas y CuZn-SOD en los cloroplastos, citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Arreola-Cortés *et al.*, 2010). Las SOD's extracelulares han sido descritas previamente en células animales y en plantas tales como: espinacas, pino y algodón (Kim *et al.*, 2008).

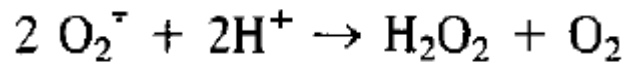


Figura 3. Ecuación química de catálisis de la enzima superóxido dismutasa.

Catalasa

La enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) en plantas, se ha encontrado principalmente en los peroxisomas y en los glioxisomas, su función es la de remover el H_2O_2 (Fig. 4a) formado durante la fotorespiración o en la β -oxidación de ácidos grasos en los glioxisomas (Lazarow y Fujiki, 1985; Tolbert, 1981). A pesar a que no está ampliamente distribuida en la célula, puede desempeñar un papel muy importante en la defensa contra el estrés oxidativo, ya que el peróxido de hidrógeno puede difundirse a través de las membranas. Al igual que catalasa, hay gran variedad de peroxidasa en plantas que neutralizan el peróxido de hidrógeno, estas enzimas requieren un sustrato o cofactor (R) para llevar a cabo la catálisis (Fig. 4b).

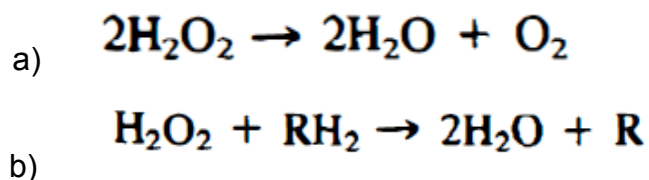


Figura 4. Ecuaciones químicas de catálisis del peróxido de hidrógeno, a) catalasa y b) peroxidasa.

Los estudios para evaluar los efectos del estrés oxidativo en los procesos de crioconservación son escasos, aún cuando durante este procedimiento los tejidos vegetales están expuestos a una gran variedad de estreses (Benson y Bremner, 2004). El estrés oxidativo que provoca daño en membrana y en la actividad de las enzimas antioxidantes. Roach *et al.* (2008) evaluaron el estrés oxidativo en embriones de castaños en la etapa de escisión y desecación, cuantificando el radical superóxido y la integridad de la membrana, encontrando que al realizar el corte del explante hay producción del radical superóxido; de igual forma a diversos niveles de estrés por la desecación disminuyó la viabilidad y la integridad de la membrana.

En lo referente a cambios bioquímicos Wen *et al.* (2010) evaluaron cambios citológicos y fisiológicos en embriones de maíz durante el proceso de crioconservación, encontrando que la viabilidad disminuye en la deshidratación, el daño a membrana se produce principalmente por el congelamiento y la actividad de las enzimas antioxidantes se vieron afectadas tanto por la deshidratación como por el congelamiento. Por otra parte, Lynch *et al.* (2011) analizaron el efecto de los pre-tratamientos con osmolitos en el estrés oxidativo y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa) en embriones somáticos de olivo, encontrando que la aplicación de de 0.75 M de sacarosa aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes.

Como se puede observar, son muy pocos los ensayos donde cuantifican este tipo de estrés en los tejidos crioconservados. Falta mucho por conocer en ese aspecto y sobre todo conocer que etapas son las que causan mayor alteración en los tejidos, lo que puede permitir buscar alternativas para disminuir al máximo la modificación fenotípica, morfología y genética de las plantas. En el caso específico de vid, en los protocolos de crioconservación no se ha cuantificado el estrés oxidativo desde el punto de vista bioquímico y genético.

Variabilidad Genética

En teoría las actividades metabólicas a temperaturas de nitrógeno líquido son reducidas a cero, por lo tanto, el tejido crioconservado debería ser genéticamente idéntico al fenotipo no tratado (Dumet y Benson, 2000). Un gran número de estudios muestran que no hay evidencia morfológica, citológica, bioquímica o molecular que demuestre alteraciones en las plantas que fueron preservadas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Harding, 2004). Sin embargo, el proceso de crioconservación puede involucrar algunas alteraciones inducidas. Por ello es necesario determinar la integridad genética y el estrés oxidativo de los explantes después del almacenamiento en nitrógeno líquido (Ashmore, 1997).

La inestabilidad genética y las variaciones somaclonales pueden causar diferencias en el genotipo y fenotipo de las plantas crioconservadas (Harding, 2004). Por consiguiente se han evaluado a diferentes niveles, pero el número de cromosomas y su morfología son los parámetros citogenéticos primarios que deben mantenerse estables después de la crioconservación (Surenciski *et al.*, 2007). Alteraciones en el nivel de ploidía es una de las variaciones genéticas más frecuentes en sistemas *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1981). Sin embargo, la inestabilidad cromosómica es también influida por el genotipo y las condiciones del cultivo de tejidos (Surenciski *et al.*, 2007).

En lo referente a la estabilidad genética o modificaciones en el código genético, Harding (2004) manifestó que el concepto de estabilidad genética aún no tiene una correcta definición científica cuando se refiere a juzgar la estabilidad de las plantas después de la crioconservación. Este autor propone el término de “criobionómica” a la ciencia biológica que estudia el comportamiento de los organismos crioconservados y su hábitat después de su reintroducción a las condiciones naturales del medio ambiente. Sin embargo, todos los procesos de la crioconservación pueden causar modificaciones en el genoma en los tejidos;

dependiendo de numerosos factores como la susceptibilidad del genotipo, la aclimatación y los crioprotectores (Johnston *et al.*, 2007).

Los cambios en el genoma en tejidos crioconservados son a menudo desconocidos, esto se debe básicamente a que existe poca información sobre los efectos de la crioconservación en la estabilidad genética del material vegetal y las diferentes técnicas utilizadas para medirla poseen algunas limitaciones, lo que hace muy difícil una evaluación acertada (Engelmann, 2000; Turner *et al.*, 2001b; Helliott *et al.*, 2002; Harding, 2004). Sin embargo, hay muchos retos con respecto a la evaluación de los cambios genéticos que pudieran generarse (Harding, 2004) en los tejidos crioconservados. Es por ello, que recientemente se han implementando nuevas formas de detección haciendo uso de numerosos marcadores moleculares, los cuales se mencionan a continuación.

Técnicas de Detección de Cambios Genéticos en Plantas Crioconservadas

Los enfoques que se han utilizado para entender la variación genética en especies vegetales crioconservadas incluyen principalmente isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP) y microsatélites. La elección de los distintos marcadores utilizados depende de varios factores, tales como el tipo de pregunta de investigación que se desee responder, así como a ciertas características intrínsecas del marcador, facilidad de su uso y costo. Sin duda la elección de los marcadores debe estar guiada por el modelo de mutación al que se ajustan y por ello a los algoritmos de inferencia de los parámetros genéticos (Piñero *et al.*, 2008). Es por ello, que a continuación se enlistan los principales marcadores moleculares utilizados en el análisis de variación genética en plantas sometidas al proceso de crioconservación.

Isoenzimas

Las isoenzimas son distintas formas moleculares de una misma enzima, que presentan especificidad por el mismo sustrato y se observan en el mismo individuo (Markert y Moller, 1959). Una herramienta para estudios de estabilidad genética basado en caracteres bioquímicos, donde se estudian las isoenzimas o proteínas por electroforesis (Ferguson, 1989). Los principales usos de las isoenzimas están relacionados con la obtención de mapas genéticos para estudios de caracterización de especies como es el caso del maíz (*Zea mays* L.) (Goodman *et al.*, 1980; Stuber *et al.*, 1988)) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Tanksley y Rick, 1980). De igual forma es ampliamente utilizado en evaluaciones genéticas de tejidos crioconservados, sin embargo, el número de isoformas de una enzima normalmente no es muy grande lo cual restringe la capacidad de encontrar diferencias y además no detectan modificaciones nucleotídicas producidas en regiones no codificadoras en el genoma.

Faloci *et al.* (2000) realizaron la crioconservación de paraíso gigante (*Melia azedarach* L.) evaluando 9 sistemas isoenzimáticos como diaforasa, esterasa, malato deshidrogenasa, enzima málica, peroxidasa, entre otras; obteniendo patrones de bandas idénticos en tejidos crioconservados y los testigos. De igual forma, Liu *et al.* (2004) emplearon la isoenzima de peroxidasa para el análisis genético de brotes de manzana cv “Gala” crioconservados mediante vitrificación y no encontraron diferencias en los tejidos crioconservados con respecto a los no almacenados en nitrógeno líquido.

RFLP

Análisis molecular de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP por sus siglas en inglés (Restriction Fragment Length Polymorphism). Es una técnica muy utilizada en el análisis de variación

genética poblacional. El análisis genómico mediante RFLP presenta ventajas en el aspecto de que es posible analizar todo el genoma, con sus regiones codificadoras y no codificadoras. Sin embargo, el inconveniente es que esta técnica es muy laboriosa y costosa (Hallerman y Beckman, 1988).

Por tal razón, esta metodología ha sido poco utilizada para determinar la estabilidad genética en plantas crioconservadas. En papa (*Solanum tuberosum*) se concluyó que las plántulas se mantuvieron sin cambios en su perfil de RFLP, en comparación con los controles no tratados (Harding, 1991). El uso de esta herramienta permite evaluar la estabilidad y los posibles efectos perjudiciales del cultivo *in vitro* o crecimiento lento, la variación somaclonal, crioprotectores y lesión por congelación (Harding, 1991).

Microsatélites o Secuencias de Repetición simples (SSR)

Los microsatélites o secuencias de repetición simples (SSR) son un marcador molecular muy utilizado debido a que son regiones del genoma de secuencia corta que se repite cierto número de veces, y ha ganado popularidad debido a que son abundantes, están distribuidos regularmente en el genoma y se heredan de forma co-dominante. Debido a ello, los SSR están adquiriendo una importancia creciente en los últimos años en estudios sobre el análisis de variabilidad genética, relaciones entre especies (Buchanan *et al.*, 1994; Marklund *et al.*, 1994; Petit *et al.*, 1998; Moazami-Goudarzi *et al.*, 1997) y efectos de la crioconservación.

En la evaluación de la estabilidad genética de la crioconservación se utilizaron SSR para analizar la conservación de zarzamora y frambuesa almacenada en nitrógeno líquido por un periodo de 12 años y no se encontraron diferencias morfológicas entre las plantas crioconservadas comparadas con las plantas control. Para el análisis molecular se utilizaron 10 cebadores, donde no se observaron diferencias entre los brotes crioconservados y los correspondientes

a las plantas madre; en este caso no se detectaron polimorfismos mediante esta técnica. Los SSR han sido utilizados en diversos cultivos como papa (Harding y Benson, 2001), *Actinidia* (Palombi y Damiano, 2002), *Theobroma* (López *et al.*, 2004) y *Populus* (Rahman y Rajora, 2001).

AFLP

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo en inglés AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), la característica clave de esta técnica molecular basada en PCR es su capacidad de escanear simultáneamente muchas regiones diferentes de ADN distribuidas aleatoriamente en el genoma. Combina las ventajas del método enzimático para producir los fragmentos de restricción y posteriormente realizar el análisis mediante PCR (Vos y Kuiper, 1997; Vos *et al.*, 1995). En esencia, los métodos de AFLP permiten la detección alteraciones en el tamaño de fragmentos de restricción mediante amplificación por PCR. Este tipo de marcador molecular han demostrado ser muy útil para la evaluación de las diferencias genéticas entre los individuos, poblaciones y especies.

Los AFLP no han sido tan ampliamente utilizados en ensayos de variabilidad genética, sin embargo existen algunos reportes donde se ha utilizado en tejidos crioconservados. Zarghami *et al.* (2008) analizaron plántulas de papa cvs 'Agrida' y 'Marphona' siguiendo la metodología de encapsulación-deshidratación. Ellos utilizaron 7 iniciadores y obtuvieron similitudes con las plantas testigos en los cultivares 'Agrida' y 'Marphona' del 97 y 100% respectivamente. Por lo tanto, concluyen que no hay evidencia suficiente que sugiera que las plantas crioconservadas son diferentes genéticamente a las plantas controles, tal como lo respaldan los reportes para fresa, manzana, uva y kiwi utilizando AFLP (Hao *et al.*, 2001, 2002; Zhai *et al.*, 2003). Sin embargo en las muestras crioconservadas de fresa se observó un fragmento adicional diferente con

respecto a la planta control, lo cual es atribuido a cuestiones epigenéticas, un cambio en el estado de metilación del ADN (Hao *et al.* 2002).

RAPD

El análisis de RAPD es una técnica de medición de la variación del ADN al azar. Esta metodología se basa en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha tenido mucho auge debido a que presentan ventajas sobre los análisis bioquímicos como las isoenzimas. Mediante RAPD se puede detectar polimorfismo en el ADN codificante y/o mitocondrial. RAPD detecta ADN del cual no se conoce su secuencia nucleotídica y se lleva a cabo a través de secuencias cortas de oligonucleótidos (10 pb) que se emplean como cebadores. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de la diversidad genética en gran número de especies vegetales (Bauert *et al.*, 1998; Huff *et al.*, 1998).

En lo referente a detectar modificaciones genéticas debido al proceso de crioconservación se ha evaluado satisfactoriamente mediante RAPD. En uva y kiwi se analizó la variabilidad mediante dicha técnica y no se encontraron diferencias entre el ADN de las plantas control y las crioconservadas (Zhai *et al.*, 2003). De igual forma en árbol del paraíso se evaluaron 16 cebadores de los cuales la mayoría dieron productos de amplificación nítidos y reproducibles, solamente uno no fue válido, dando como resultado que el tratamiento de crioconservación no indujo variabilidad genética a las plantas testigos existentes (Faloci *et al.*, 2000). Por otro lado, en palma datilera Bekheet *et al.* (2007) no encontraron diferencias en la variabilidad genética al aplicar el congelamiento y el descongelamiento en cultivos nodulares. Al igual que los resultados obtenidos por Saker *et al.* (2000) donde encontraron variación genética solamente del 4% en las plántulas recuperadas después de la crioconservación en comparación con los controles. La técnica de RAPD ha sido utilizada

igualmente en brotes de *Betula pendula* Roth (Ryynänen, 1998), *Arachis hypogaea* (Gagliardi *et al.*, 2003), *Humulus lupulus* L. (Peredo *et al.*, 2008) y *Prunus Ferlenain* (Helliot *et al.*, 2002).

Hasta el momento no se han detectado diferencias genéticas en las plantas que han sido almacenadas por crioconservación respecto a sus controles. Las técnicas moleculares que se han empleado poseen sus limitaciones, por lo que es necesario realizar más estudios para dar mayor certeza a esta afirmación. Autores como Fukai *et al.* (1994) encontraron modificaciones fenotípicas que afectaron el color en las flores del crisantemo después de la regeneración de meristemas crioconservados; sin embargo, la mayoría de los estudios que se les realizó indicaron que las plantas no presentaron cambios morfológicos después de la crioconservación. Por consiguiente para un protocolo exitoso de conservación de germoplasma, se deben estandarizar los procesos y realizar las evaluaciones más convenientes para cada especie.

Existen muy pocos estudios bioquímicos y moleculares en vid crioconservada. En este contexto, Zhai *et al.* (2003) crioconservaron cuatro cultivares de uva “Cabernet franc”, “Chardonnay”, “Fengh 51” y “LN33” donde evaluaron mediante RAPD la variabilidad genética empleando 7 iniciadores; y concluyeron que no hay diferencias entre el ADN de las plantas control y las crioconservadas. Por otra parte, la estabilidad genética en plantas recuperadas puede estar asociado con cambios en la metilación del ADN (Harding, 1997; Hao *et al.*, 2001). Siendo un regulador epigenético importante de la expresión génica implicada en muchos procesos del desarrollo de las plantas (Finnegan *et al.*, 2000; Bender, 2004). Sin embargo, las alteraciones genéticas generadas por la crioconservación no se han definido específicamente, es por ello, que es importante esclarecer los puntos críticos de la metodología para detectar posibles cambios en las especies que pudieran alterar sus características fenotípicas. Sobre todo, cuantificar este tipo de variaciones en plantas de vid crioconservadas, debido a que no han sido evaluadas en aspectos moleculares

y bioquímicos; y así obtener un proceso de crioconservación adecuado, reproducible y seguro.

III. HIPÓTESIS

La vitrificación es un método que permite conservar el germoplasma de vid (*Vitis vinifera* L.) variedad "Flame seedless" sin alterar su estabilidad celular.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la técnica de vitrificación y su efecto sobre la variabilidad genética y el estrés oxidativo de vid (*Vitis vinifera L.*) cultivar “Flame seedless”.

Objetivos Específicos

- Establecer el tiempo de incubación en la solución de vitrificación de plantas No. 2 (PVS2) de yemas axilares de *Vitis vinifera L.* cv “Flame seedless”.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en tejidos crioconservados.
- Evaluar el contenido de malondialdehído (MDA) en yemas crioconservadas.
- Estudiar la estabilidad genética del material crioconservado mediante el análisis de RAPD.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Para esta investigación se utilizaron yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” provenientes de varetas de vid conteniendo entre 5 y 7 yemas axilares en la poda realizada en diciembre del 2012 en el viñedo “Casas Grandes”, ubicado en el kilometro 40, por la carretera 36 norte, en la Costa de Hermosillo, Sonora, México. Las varetas fueron seleccionadas al azar, se lavaron y desinfectaron con solución jabonosa conteniendo hipoclorito de sodio (cloro comercial NaOCl 1%) y posteriormente lavadas tres veces con agua corriente. Posterior a esto, las varetas fueron colocadas en sustrato “Pro-Mix” humedecido y almacenadas a 20°C. Para realizar los tratamientos, de dichas varetas se disectaron las yemas axilares con ayuda de un bisturí.

Ensayo de Viabilidad

Se realizó un primer ensayo de vitrificación para determinar el tiempo de incubación con la solución PVS2. El procedimiento de vitrificación se realizó de acuerdo a lo reportado por Matsumoto *et al.* (1995). Se colocaron tres yemas en un tubo eppendorf de 1.5 mL por triplicado para cada tratamiento con la solución de vitrificación PVS2 esterilizada mediante filtración. La solución PVS2 (Solución de Vitrificación de Planta N° 2; Sakai *et al.*, 1990) contiene 30% (m/v) glicerol, 15% (m/v) etilen-glicol y 15% (m/v) dimetil sulfóxido disuelto en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0.4 M sacarosa (pH 5.8). A las yemas

desinfectadas se le agregó 1 mL de la solución PVS2 y se incubaron en agitación a temperatura ambiente 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min. Después de cada tiempo de incubación (se realizó el muestreo, M1) posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido e inmediatamente se sacaron para realizar el muestreo dos (M2); las yemas remanentes se mantuvieron en nitrógeno líquido por una hora, posteriormente se sacaron los crioviales (muestreo M3). Parte de las yemas congeladas por 1 h en NL se descongelaron a 38°C por 3 min siendo el muestreo número cuatro (M4). Después de cada muestreo se eliminó la solución PVS2 lavando los tejidos tres veces con agua destilada estéril y posteriormente se realizaron los análisis de viabilidad.

Análisis de viabilidad

La viabilidad se determinó mediante el ensayo espectrofotométrico de tinción con tetrazolio según la metodología reportada por Steponkus y Laphear (1967) y modificada por González-Benito *et al.* (2009). Se utilizó la solución de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 0.1% (Sigma) disuelto en buffer de fosfatos de potasio (KH_2PO_4 y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ neutralizada a un pH de 7.5). La solución de TTC se añadió a los tejidos para una posterior incubación a 30°C durante 24 horas en oscuridad. Posterior a ello, se drenó la solución de TTC y se lavó el tejido con agua destilada estéril. Se extrajo el formazan (producto final obtenido, coloración roja) cortando las yemas longitudinalmente y se colocaron en tubos adicionando 5 mL de etanol al 95%. Se incubó a 80°C durante 10 minutos. Se dejó enfriar y el extracto se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se determinó su absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 (Varian). La determinación de cada extracto se realizó por triplicado.

El porcentaje de viabilidad se cuantificó mediante la cantidad de formazan

obtenido a 530 nm por los tejidos a los diferentes tratamientos contra la cantidad de formazan producido por los controles, como se muestra en la fórmula siguiente. Tomando a consideración que la cantidad mínima de reducción de TTC por los tejidos para que sobrevivan no debe disminuir del 50%.

$$\% \text{ Viabilidad muestra} = (\text{Abs}_{530} \text{ muestra} \times 100) / \text{Abs}_{530} \text{ control}$$

Crioconservación (Inmersión directa en NL)

Las yemas axilares disectadas, se desinfectaron por 5 min en agitación en una solución de cloro comercial al 25% (1.3% de NaOCl) más Tween 20 al 0.1%. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril, posteriormente se le adicionó benomilo 100 ppm por 3 min y se lavaron de nuevo con agua destilada estéril y después con etanol al 70% y finalmente con agua destilada estéril tres veces. Las yemas desinfectadas (n=5) fueron transferidas a criotubos de 2 mL (cinco replicas para cada tratamiento) y fueron colocadas en nitrógeno líquido (NL); se realizó el primer muestreo antes de congelar las yemas (control sin congelamiento, M1). Posteriormente los criotubos fueron directamente sumergidos en nitrógeno líquido, se realizó un muestreo al tiempo inicial al congelamiento (unos segundos, M2) y otros almacenados por una hora (A), un día (B), una semana (C) y un mes (D). Después de cada tratamiento de congelación, se tomó un muestreo sin descongelar y otro aplicando una descongelación en baño de agua a 38°C durante 3 min.

Vitrificación

Las yemas fueron tratadas según el procedimiento descrito por Matsumoto *et al.*, (1995) utilizando la solución de vitrificación de plantas N° 2 (PVS2). Las

yemas se desinfectaron como se describe en el proceso de crioconservación. Una vez desinfectadas fueron transferidas a criotubos de 2 mL (cinco replicas por tratamiento) a los cuales se les adicionó 1 mL de la solución PVS2 esterilizada mediante filtración y sus controles (sin PVS2). Se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación durante 180 min. Después del tiempo de vitrificación se realizó el primer muestreo antes de congelar las yemas (sin congelamiento, M1). Posteriormente los criotubos fueron directamente sumergidos en nitrógeno líquido, se realizó un muestreo inmediatamente después del congelamiento (tres segundos, M2) y otros almacenados por una hora (A), un día (B), una semana (C) y 1 mes (D). Después de cada tratamiento de congelación, se tomó un muestreo sin descongelar y otro aplicando descongelación en baño de agua a 38°C durante 3 min. Después se retiró la solución PVS2 y las yemas se lavaron con agua destilada estéril.

Peroxidación Lipídica

La peroxidación de lípidos se determinó cuantificando la concentración de malondialdehído. Para la extracción del MDA de las yemas tratadas y sus controles se trituraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual fue homogenizado con buffer de fosfatos 50 mM (2.8% de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1.8 % de Na_2HPO_4) a un pH de 8.3 y se centrifugó a 12,000 rpm por 50 min. Se tomó el sobrenadante para la cuantificación de MDA (Heath y Packer, 1968; Fu y Huang, 2001). Utilizando el kit Oxitek TBARS assay (ZeptoMetrix Corporation), el cual contiene las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico las cuales se prepararon con base a las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de MDA se preparó una curva de calibración, utilizando concentraciones de MDA de 0, 12.5, 25, 50 y 100 nmoles/mL proveído por el kit (ZeptoMetrix Corporation).

En un tubo se agregaron 100 µL del extracto obtenido y de los estándares preparados (para la curva estándar) a los cuales se les adicionó 100 µL de la solución SDS (dodecil sulfato de sodio) y se mezcló. Después se le agregó 2.5 mL del buffer de TBA (ácido tiobarbitúrico disuelto en ácido acético y en hidróxido de sodio) y se mezcló vigorosamente. Se taparon los tubos y se incubaron por 60 min a 95°C. Posteriormente al tiempo de incubación se sacaron del baño y se colocaron en hielo (a temperatura ambiente) por 10 min. Se centrifugaron a 3,000 rpm por 15 min. Se tomo el sobrenadante y se cuantificó la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50, Varian). La determinación de cada extracto se realizó por triplicado. El nivel de MDA se expresó como µmol por g de peso fresco.

$$[] \text{ MDA (nmol/mL)} = (\text{Abs}_{532} \text{ muestra} - 0.0033) / 0.0037$$

Extracción Enzimática

Se utilizaron aproximadamente 0.5 g de tejido los cuales se pulverizaron con nitrógeno líquido para formar un polvo, al cual se le adicionó 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1 M pH 6.8 conteniendo 200 mg de polivinil pirrolidona (PVP) y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) para inhibir la actividad de proteasas. La mezcla se agitó en vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante recuperado se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 20 min a 4°C. Se separó el sobrenadante del precipitado y éste extracto se utilizó para la determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y para la cuantificación de proteína total (Bradford, 1976). Todo el procedimiento de extracción se realizó a 4°C con cinco replicas para cada tratamiento (Ramírez-Serrano *et al.*, 2008).

Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de SOD total (E.C. 1.15.1.1) se determinó midiendo su habilidad para inhibir la reducción fotoquímica del azul de tetrazolio (NBT) de acuerdo al método modificado de Beyer y Fridovich (1987). El extracto enzimático (400 mL, diluido 1:10) se agregó a la mezcla de reacción la cual consta de: buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.8, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.1 mM, L-metionina 12 mM, NBT 75 μ M y riboflavina 2 μ M en un volumen de reacción total de 3 mL. La mezcla de reacción se colocó bajo luz fluorescente por 15 min a 25 °C, el blanco de reacción contiene la mezcla antes mencionada también con el extracto enzimático, pero sin exposición a la luz. Se determinó la actividad catalítica, cuantificando la reducción del NBT por la SOD, la cual fue medida por el cambio de absorbancia a 550 nm. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50% de la máxima inhibición de NBT a azul (formazan), expresando la actividad de los extractos como unidades SOD por mg de proteína. La determinación de cada extracto se realizó por triplicado. El porcentaje de fotoinhibición para todas las muestras fue calculada bajo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs blanco}] \times 100$$

Para normalizar a unidades de SOD, la definición original de la actividad de SOD bajo este ensayo se refiere a 1 U SOD = 50% de la inhibición, por lo tanto se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{U/mL SOD} = [1 \text{ unidad SOD} \times (\% \text{ de inhibición} / 50 \%)]$$

$$\text{U/mg de proteína} = \text{U/mL de SOD} / \text{mg de proteína}$$

Actividad de Catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6) se determinó a 25 °C de acuerdo al método descrito por Aebi (1984). La mezcla de reacción (1 mL) contiene 500 µL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 400 µL del extracto enzimático (diluido 1:10) y se inició la reacción adicionándole 100 µL de H₂O₂ 100 mM. Se determinó la actividad catalítica siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 1 min a 25°C en espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 (Varian). La actividad de catalasa se expresa como unidades por mg de proteína. Se realizó la determinación de catalasa por triplicado y se utilizó como blanco el buffer de fosfatos (Ramírez-Serrano *et al.*, 2008).

La actividad de CAT (U/mL), la actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U) definiéndose como la transformación de 1 µmol por minuto durante la reacción enzimática, por lo tanto para el cálculo de las U/mL se utilizó la siguiente fórmula:

$$U/mL = (\Delta Abs / \epsilon b t)(V_f)$$

Donde:

ΔAbs = Cambio de absorbancia de la muestra

ϵ = coeficiente de extinción del peróxido de hidrógeno (0.036 cm²/µmol)

b = espesor de la celda (1 cm)

t = tiempo (1 min)

V_f = volumen final de la mezcla de reacción (1 mL)

Los resultados obtenidos fueron normalizados a unidad por miligramo de proteína:

$$U/mg = U/mL / \text{cantidad proteína (mg/mL)}$$

Proteína Total

La cantidad de proteína total fue determinada de acuerdo al método de Bradford (1976). Se disolvieron 100 mg de azul brillante (Coomassie® Brilliant Blue G-250) en 50 mL de etanol al 95% a temperatura ambiente, después se le adicionó 100 mL de ácido fosfórico al 85% (m/v) se llevó a un volumen de 1L con agua destilada. El reactivo se filtró y almacenó en un frasco ámbar a 4°C. Se determinó la cantidad de proteína de las muestras agregando en un tubo: 100 µL del extracto enzimático, 100 µL de agua destilada estéril y 1 mL del reactivo de Bradford; se mezclaron y después de 5 min se determinó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó como blanco 200 mL de agua destilada estéril más 1 mL de reactivo Bradford. Se utilizó una curva estándar de proteína utilizando suero de albúmina bovina (BSA) desde una concentración de 0 hasta 100 µg con intervalos de 10 µg. La determinación se realizó por triplicado.

$$[] \text{ proteína } (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{595} \text{ muestra} - 0.214) / 0.1156$$

Aislamiento del ADN Genómico

El ADN genómico de los tejidos crioconservados se aisló utilizando el método con CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio) de acuerdo a Japelaghi *et al.*, 2011. El buffer de extracción (300 mM de Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 2 M de NaCl, 2% (m/v) de PVP (polivinil pirrolidona) soluble, 2% (m/v) CTAB) se esterilizó y antes de utilizarse en las extracciones se pre-calentó a 65°C por 20-30 min y se le adicionó 2% (v/v) de β-mercaptoetanol. Las yemas (500 mg) se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero estéril hasta formar un polvo fino. Este tejido pulverizado se colocó en un tubo de 2 mL y se les agregó 1 mL de buffer de extracción. Los tubos se mezclaron vigorosamente en vortex por 5 min para posteriormente incubarlos a 65°C en un baño por 20-30 min. Al terminar la incubación nuevamente los tubos se agitaron en vortex por 2 min y

se enfriaron los tubos a temperatura ambiente. A los mismos tubos se les agregó un volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1, v/v), se mezclaron mediante agitación en vortex hasta que las dos fases formaron una emulsión; después se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min.

Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo y se volvió a extraer con un volumen igual de cloroformo-álcool isoamílico (24:1, v/v) y se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm por 5 min. Se colectó la fase acuosa y se puso en un tubo nuevo, se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y un volumen de isopropanol, se mezcló por inmersión y se precipitó toda la noche a -20°C. Posterior al tiempo de precipitación de ácidos nucleicos se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. Se eliminó la fase líquida y se dejó secar el precipitado; posteriormente se lavó con etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se dejaron secar al aire por 10 min y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua-DEPC (pirocarbonato de dietilo) y se almacenaron a -20°C. La calidad del ADN fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración se determinó utilizando un Nanodrop modelo ND 1000 (Thermo Scientific).

Análisis de RAPD

Para el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se utilizaron los iniciadores OPA-01, OPA-04, OPF-05, OPM-03, OPO-10, OPF-08, OPO-11, OPA-09, OPA-15, OPA-04, OPO-02, OPA-02, OPB-07, OPE-15 y OPE-03 de Operon Technologies Inc. (Huntsville, AL, USA), reportados por Maia *et al.* (2009). La amplificación se desarrolló en un volumen total de 25 µL conteniendo 50 ng de ADN genómico, 1X buffer de PCR (5X Green GoTaq® Flexi Buffer), 25mM de MgCl₂, 2.5 mM dNTPs, 500 ng de los iniciadores, 0.3 Unidades de Taq ADN polimerasa (GoTaq® DNA polymerase). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador modelo Swift™ MaxPro (ESCO, Singapur)

con la programación de: 5 min a 94°C, y 45 ciclos de 94°C por 45 s, 35°C por 45 s y 72°C por 1min con una extensión final de 72°C por 5 min (Maia *et al.*, 2009).

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.5% con buffer 1X TBE (90 mM Tris-Base, 90 mM de ácido bórico y 2 mM de EDTA; pH 8.0) a 100 Volts durante 2 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y fotografiadas en fotodocumentador (Clear View UV Transilluminator, Cleaver Scientific Ltd.). Se utilizó 1 kb plus (Invitrogen™) como marcador de ADN. Los fragmentos obtenidos fueron analizados comprando los perfiles de RAPD de cada tratamiento en términos de presencia o ausencia de amplicones.

Diseño Experimental y Análisis de Datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos aleatorizado en los datos de viabilidad y proteína. Se aplicó un diseño completamente al azar en los datos de MDA y enzimas. Las medias fueron comparadas estadísticamente utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey-kramer a un nivel de significancia del 95%. La homogeneidad de datos fue evaluada mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los datos se analizaron mediante con paquete estadístico NCSS (Number Statistical System) versión 2007.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de Viabilidad

En la figura 5, se muestra el porcentaje de viabilidad a diferentes tiempos de incubación con PVS2, el porcentaje de viabilidad no se alteró ($P > 0.05$) por los diversos tratamientos realizados durante el proceso de vitrificación o por el proceso de descongelamiento. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad en las yemas axilares de vid difiere ($P < 0.05$) dependiendo del tiempo de incubación empleado en la solución PVS2. El análisis estadístico detectó diferencias en los tiempos de 150 y 180 minutos ($P < 0.05$) con un valor promedio del 90% de viabilidad. En los tiempos de 30 hasta 120 min no se encontraron diferencias ($P > 0.05$). Por esta razón, se utilizó el tiempo de 180 min como tiempo para la incubación en PVS2 en el ensayo de vitrificación aún cuando los datos obtenidos a los 150 y 180 min fueron similares.

Por otra parte, se observan valores altos de viabilidad (Fig. 5) que sobrepasan el 100% valores (mayores a los controles). Este comportamiento es probablemente debido al estado fisiológico de las yemas utilizadas y a la variabilidad de desarrollo de las varetas las cuales fueron obtenidas de distintas plantas de vid donde el crecimiento y desarrollo de las mismas no es homogéneo. Así mismo, las yemas axilares suelen ser de diversos tamaños y estadios de desarrollo, tanto para la yema primaria, secundaria y terciaria. Una yema normal pasa por varias fases de desarrollo desde que comienza a formarse en la axila de la hoja hasta que brota: paralatencia, entrada en endolatencia, endolatencia, salida de endolatencia y ecolatencia (Martínez,

1991). Por consiguiente el porcentaje de viabilidad puede variar en determinado estadio de madurez del tejido. Tal como lo reportan Sosa-Luría *et al.* (2012) en embriones de *Bromeliaceae* donde obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad en embriones completamente desarrollados con un 89% en contraste con un 31.6% en embriones en un estadio de desarrollo incompleto.

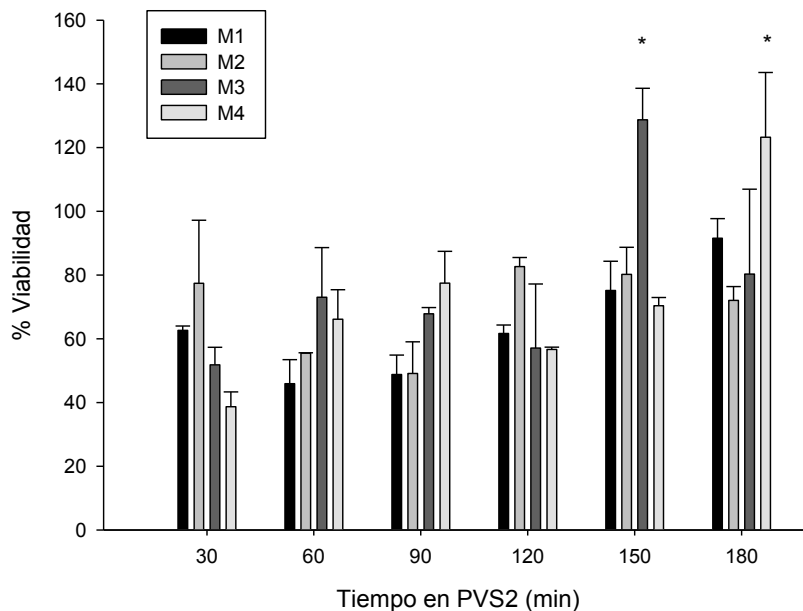


Figura 5. Porcentaje de viabilidad en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” crioconservadas por una hora en nitrógeno líquido a diferentes tiempos en la solución PVS2. M1: yemas en PVS2 sin congelar, M2: unos segundos en NL (tiempo inicial), M3: yemas con PVS2 y una hora en NL, M4: yemas en PVS2 y a una hora en NL con descongelamiento a 38°C por 3 min. Las líneas en las barras indican el error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas según Tukey-kramer ($P < 0.05$).

En este estudio el porcentaje de viabilidad respecto al tiempo de incubación en la solución PVS2 tuvo una tendencia a aumentar en los tiempos mayores de incubación, tal como reportan Shatnawi *et al.* (2011) donde vitrificaron meristemos y evaluaron dos soluciones vitrificantes PVS2 y MPVS2; de igual forma emplearon diversos tiempos de incubación en ambas soluciones de: 0,

20, 40, 80, 120, 160 y 200 min a 0°C. En los tejidos vitrificados obtuvieron al tiempo de 40 min una mayor regeneración con un 55%, observándose un comportamiento de campana ya que la regeneración aumentó desde el control (0 min) hasta los 40 min y disminuyó con mayores incrementos en el tiempo hasta alcanzar 2.7% de viabilidad a los 200 min.

Las yemas axilares de vid cv “Flame seedless” soportaron tiempos altos de incubación en la solución crioprotectora PVS2, lo cual puede ser debido a que las yemas axilares empleadas cuentan con escamas ó capas protectoras en forma triangular y bajo las cuales existe una segunda capa protectora llamada algodón ó borra, y ambas recubren la parte meristemática (Almanza *et al.*, 2010). Esto probablemente funciona como barrera para la penetración del compuesto crioprotector, por lo cual se requieren mayores tiempos de incubación. En contraste, la mayoría de los protocolos de vitrificación utilizan tiempos relativamente cortos de incubación, tal como lo reportan Sharaf *et al.* (2012) donde evaluaron tiempos desde 10 a 90 minutos en PVS2 y observaron viabilidades del 100% con 60 min de incubación.

Al igual que nuestros resultados, Al-Ababneh *et al.* (2002) obtuvieron en ápices de naranja un máximo de recuperación de los tejidos al tiempo de 3 horas en la solución PVS2. Por otra parte, se reportó una sobrevivencia del 55.6 y 75 % en callos de *Crocus moabiticus* y *Crocus hyemalis* respectivamente, cuando se colocaron por 20 min en PVS2 (Baghdadi *et al.*, 2010). Lo anterior corrobora que el tiempo de incubación con la solución crioprotectora PVS2 depende en gran medida del tejido vegetal que se desee crioconservar, aún entre cultivares de la misma planta, haciendo indispensable el establecimiento de el tiempo óptimo de incubación con el crioprotector para cada tejido vegetal. En el caso de yemas de vid cv “Flame seedless” el tiempo óptimo fue de 180 minutos con PVS2 a 25°C.

Proteína Total

En la figura 6, se muestran los datos de cantidad de proteína total a los diferentes tiempos de almacenamiento en NL, comparando entre las yemas vitrificadas y las crioconservadas (muestreo M3). El impacto de los diferentes tiempos de almacenamiento en NL mostró tener un efecto significativo ($P < 0.05$) en la cantidad de proteína (Fig. 6), encontrando diferencias solo en el tiempo de un mes en NL, en los valores más altos de $45 \mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}$ tejido para las yemas vitrificadas. Este comportamiento posiblemente como un mecanismo de adaptación del tejido a temperaturas bajo cero. Debido a que se han identificado tres clases de proteínas en plantas que se acumulan en el apoplasto durante la aclimatación al frío, tales como: las proteínas que modifican la pared celular, proteínas relacionadas con la patogénesis que intervienen en la transducción de señales induciendo respuesta al estrés y proteínas anti congelantes que interactúan con el hielo extracelular (Margesin *et al.*, 2007; Taşgın *et al.*, 2006).

La cantidad de proteína total también mostró diferencias ($P < 0.05$) en lo referente al tratamiento con PVS2 (vitrificadas contra las crioconservadas) en cada uno de los tiempos de almacenamiento en NL. En dicha gráfica se muestra el decremento (dentro de cada tiempo de almacenamiento) en la cantidad de proteína total en las yemas que no fueron tratadas con PVS2, sin embargo, con respecto al control hay un aumento en la cantidad de proteína total, lo que nos indica un incremento en la síntesis proteica. Dichos datos corroboran el efecto positivo y crioprotector de la solución PVS2 a nivel proteico; fomentando el correcto funcionamiento para la síntesis de *ново* de las proteínas y evitando la degradación proteica que se induce bajo estrés (Pandey *et al.*, 2006).

Varias proteínas son expresadas en el citosol o apoplastos cuando una célula vegetal es expuesta a bajas temperaturas y juegan un papel importante de: crioprotección, metabolismo lipídico y tolerancia a la deshidratación (Margesin *et al.*, 2007; Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999). Posiblemente a ello se deba el aumento en la cantidad de proteína total en los tratamientos de vitrificación respecto al control. Comportamiento contrario a lo reportado por Poobathy *et al.* (2013) donde determinaron la cantidad de proteína de tejidos de *Dendrobium* vitrificados y obtuvieron un decremento en la cantidad de proteína total respecto al control, sin embargo el decremento drástico lo observaron en la fase de recuperación, posiblemente ya por el cese del estrés por el proceso de crioconservación. Por otra parte, en tejido de espinacas se observó también una disminución en la cantidad de proteína en las primeras etapas de aclimatación a bajas temperaturas, sin embargo en etapas posteriores de aclimatación y contacto con el frío se incrementó el contenido proteico. Este fenómeno se atribuyó a la síntesis de proteínas de tolerancia al congelamiento (Guy y Haskell, 1987).

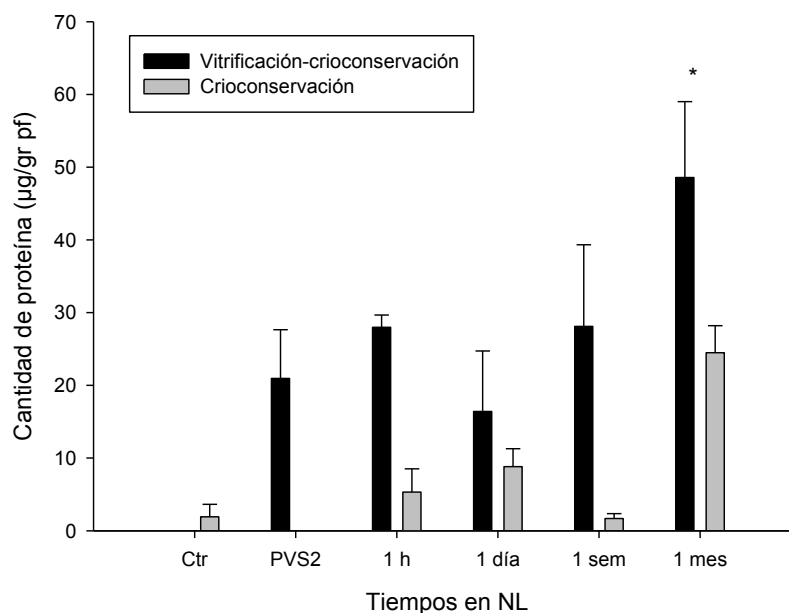


Figura 6. Efecto de la vitrificación y crioconservación por diferentes tiempos en nitrógeno líquido sobre la cantidad de proteína total en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless”. Ctr: yemas sin ningún tratamiento, PVS2: yemas después de 180 minutos de incubación PVS2, y 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes de almacenamiento en NL. Las barras indican la media \pm error estándar. El asterisco indica diferencias entre los tratamientos de tiempo de almacenamiento en NL de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

En la figura 7, se muestra el efecto de la crioconservación y vitrificación en la concentración de proteína por efecto de la aplicación de un descongelamiento a 38°C por 3 min (muestreo M4). En dicha figura se muestra el mismo comportamiento con respecto a la figura 6. Se obtuvo una mayor cantidad de proteína total en las yemas que estuvieron en contacto con la solución PVS2 dando datos estadísticamente significativos ($P < 0.05$) por efecto de la vitrificación contra la crioconservación. Los asteriscos muestran las diferencias entre los diferentes tiempos de almacenamiento en NL, siendo el tiempo de un mes en NL el que presentó mayor cantidad de proteína ($P < 0.05$) a diferencia de los otros tiempos de almacenamiento.

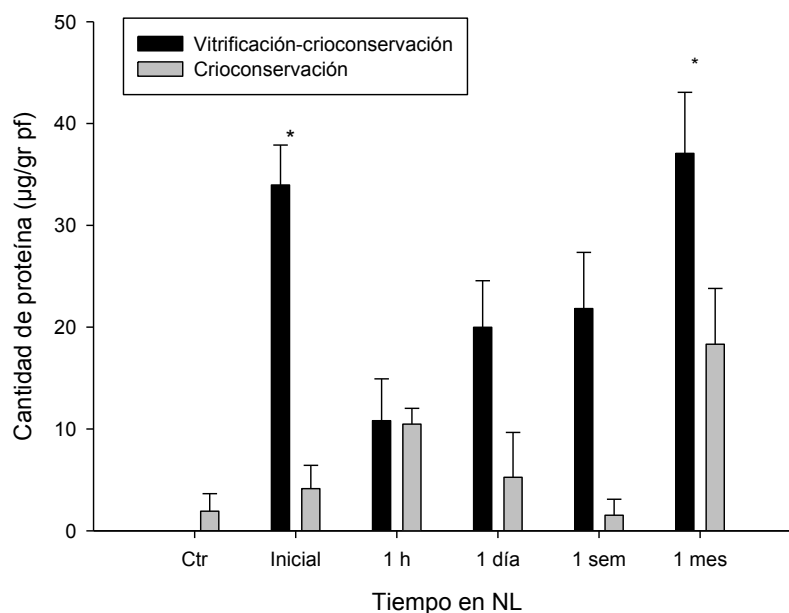


Figura 7. Efecto de la vitrificación y crioconservación por diferentes tiempos en nitrógeno líquido y con descongelamiento a 38°C por 3 min sobre la cantidad de proteína total en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless”. Ctr: yemas sin tratamiento, Inicial: unos segundos en NL, y 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes en almacenamiento en NL. Las barras indican la media \pm error estándar. Los asteriscos indican diferencias entre los tratamientos de almacenamiento en NL de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

Para la evaluación del efecto de la aplicación del proceso de descongelamiento, se compararon los datos de cantidad de proteína total en yemas con y sin descongelar (Tabla 1). Ahí se muestran la cantidad de proteína total en las yemas vitrificadas y las crioconservadas y no se detectaron diferencias ($P > 0.05$) entre el proceso de descongelamiento con y sin calor. Sin embargo, si se observó efecto en la cantidad de proteína total por contacto con la solución PVS2 y el tiempo de almacenamiento, debido a que conforme aumenta el tiempo de contacto con NL, hay mayor cantidad de proteína total principalmente en yemas vitrificadas, posiblemente como un efecto de aclimatación a las bajas temperaturas. Como se menciona anteriormente, tal vez debido a que las

plantas durante una exposición drástica a temperaturas bajo cero activan el metabolismo tanto proteico como de producción de moléculas crioprotectoras lo que permite mantener un correcto funcionamiento celular (Janska *et al.*, 2010).

Tabla 1. Efecto de la descongelación en la cantidad de proteína total en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” bajo diferentes tratamientos.

Tiempo en NL	Vitrificación		Crioconservación	
	Sin descongelar	Descongeladas (38°C/3min)	Sin descongelar	Descongeladas (38°C/3min)
	Media ± DE µg.gr ⁻¹ pf	Media ± DE µg.gr ⁻¹ pf	Media ± DE µg.gr ⁻¹ pf	Media ± DE µg.gr ⁻¹ pf
0	20.9 ± 6.7	--	1.9 ± 1.7	--
1 segundo	--	33.9 ± 3.9	--	4.1 ± 2.2
1 hora	27.9 ± 1.6	10.8 ± 4.1	5.3 ± 3.2	10.4 ± 1.5
1 día	16.4 ± 5.1	19.9 ± 4.5	8.8 ± 2.4	5.2 ± 4.4
1 semana	28.1 ± 11.2	21.8 ± 5.5	1.6 ± 0.6	1.5 ± 1.5
1 mes	48.5 ± 10.4	37.07 ± 5.9	24.4 ± 3.7	18.3 ± 5.4

Actividad Enzimática SOD y CAT

Las figuras 8 y 9 muestran los resultados correspondientes a la actividad enzimática de catalasa en yemas de vid cv ‘Flame seedless’ sometidas a crioconservación y a vitrificación a diferentes tiempos del almacenamiento. En la figura 8, se observa un decremento en la actividad de la enzima en todos los tiempos de almacenamiento respecto al control (P<0.05), tanto para los tejidos con y sin descongelamiento (38°C/3 min) no detectándose diferencias entre ambos procesos (P>0.05). El efecto del congelamiento sobre la actividad de

catalasa permite inferir que efectivamente hay un impacto en la enzima, debido a que la cantidad de proteína total también disminuyó en gran medida en los tejidos que fueron crioconservados solamente.

Hay muchos reportes respecto al efecto de las temperaturas bajo cero en diversos tejidos vegetales, en específico en la actividad de la enzima catalasa; por ejemplo, Taylor *et al.* (1974) expusieron a plántulas de maíz a temperaturas de 10°C por 1 y 3 días, y obtuvieron que conforme aumentaban los días de exposición la actividad de catalasa disminuía. Por otra parte Feierabend *et al.* (1992) emplearon temperaturas de 7°C en centeno y chícharo donde encontraron igualmente un decline de catalasa, comportamiento semejante al reportado por Mishra *et al.* 1993, donde mencionan que la exposición de trigo a 8°C inhibió en un 72% la actividad de catalasa.

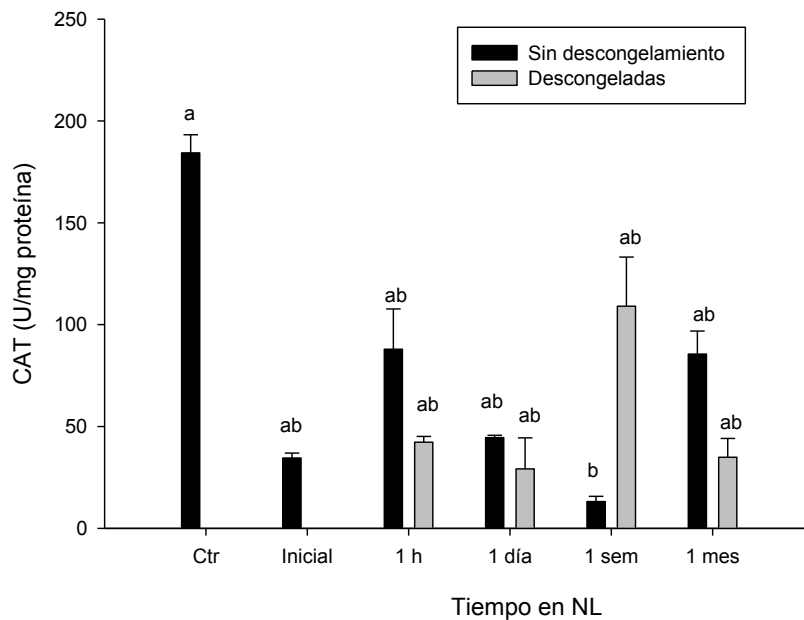


Figura 8. Actividad enzimática de catalasa (U/mg proteína) en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” crioconservadas. Donde: Ctr: yemas axilares sin ningún tratamiento, Inicial: unos segundos en NL, 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes de almacenamiento en NL. En color negro es sin el proceso de descongelamiento y en color gris las yemas con descongelamiento (38°C/3min). Las barras indican la media \pm error estándar. Las literales indican diferencias entre tratamientos de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

En la figura 9, se encuentra la actividad de la enzima catalasa en las yemas vitrificadas con los tratamientos con o sin descongelamiento. No se detectaron efectos significativos ($P>0.05$) en la actividad de CAT por el proceso de aplicación de calor para la descongelación. Por otro lado, la actividad de catalasa disminuyó drásticamente con respecto a las yemas control ($P<0.05$). Sin embargo, comparando la actividad enzimática de CAT en las yemas crioconservadas (Fig. 8) contra las vitrificadas (Fig. 9) se muestra un decremento de la actividad, pudiendo inferir que la solución PVS2 disminuyó el grado de estrés oxidativo, reflejándose en la disminución mostrada en la actividad de CAT.

A diferencia de nuestros resultados, Poobathy *et al.* (2013) crioconservaron también mediante vitrificación con PVS2 tejido embriogénico de *Dendrobium* y determinaron la actividad de CAT y no observaron diferencias en la actividad de la enzima respecto a los controles, sin embargo encuentran una tendencia a aumentar en mayor medida en la etapa de pre-cultivo con sacarosa. A diferencia a lo reportado por Wen *et al.* (2010) donde crioconservaron embriones de maíz detectando menor actividad de CAT por el proceso de deshidratación previo al proceso de congelamiento-descongelamiento. Estos resultados respaldan los datos obtenidos en el presente trabajo con respecto al efecto que tienen las diversas etapas del proceso de crioconservación a nivel enzimático. Las plantas sometidas a un determinado estrés las plantas requieren un sistema antioxidante para evitar daños, por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, el proceso de vitrificación produce menor estrés, probablemente debido a que mantuvo la estabilidad celular en las yemas.

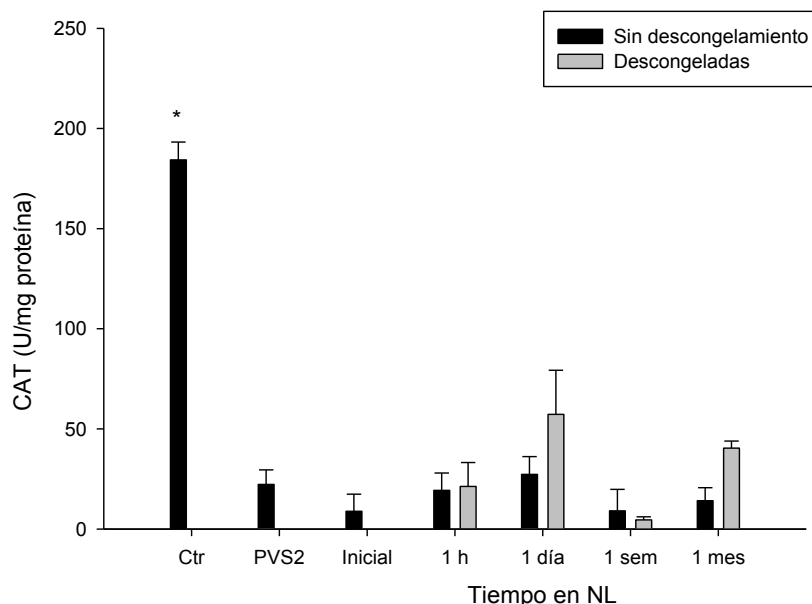


Figura 9. Actividad de catalasa (U/mg proteína) en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” sometidas a vitrificación. Ctr: yemas axilares sin ningún tratamiento, PVS2: después de incubación con el crioprotector (180 min), Inicial: unos segundos en NL, 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes de almacenamiento en NL. En color negro están las yemas sin el proceso de descongelamiento y en color gris las yemas con descongelamiento (38°C/3min). Las barras indican la media \pm error estándar. El asterisco indica diferencia de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

Por otro lado, en las figuras 10 y 11 se muestra la actividad de superóxido dismutasa en yemas de vid cv “Flame seedless” sometidas a crioconservación y a vitrificación a diferentes tiempos de almacenamiento. No se observan diferencias ($P > 0.05$) entre la actividad enzimática de SOD en las yemas crioconservadas tratadas con y sin descongelación (38°C/3 min) (Fig. 10). Sin embargo, si hay un efecto significativo ($P < 0.05$) por el tiempo de almacenamiento similar al observado en la figura 8, donde se muestra una disminución en la actividad de SOD respecto al control, demostrando así el posible daño que el congelamiento provoca a la actividad de la enzima. Al igual que en catalasa, las superóxido dismutasas (Mn-SOD y Fe-SOD) son

tetrámeros, lo cual las hace mayormente susceptibles al proceso de congelamiento (Lyons y Asmundson, 1965).

El congelamiento provoca daños a las propiedades de las membranas celulares reduciéndose así el transporte por el plasmodesmo (Wright y Simon, 1973), además de un mal funcionamiento de la respiración en la cadena de transporte de electrones, lugar fundamental para la formación de radicales libres (Lyons y Raison, 1970). Los datos obtenidos de la actividad de SOD son similares a los reportados por Wen *et al.* (2010) en la crioconservación de embriones de maíz donde también disminuyó la actividad de SOD al aplicar el congelamiento. Por lo tanto, se puede inferir que las bajas temperaturas empleadas en la crioconservación está causando la disminución de la actividad tanto de SOD como de CAT.

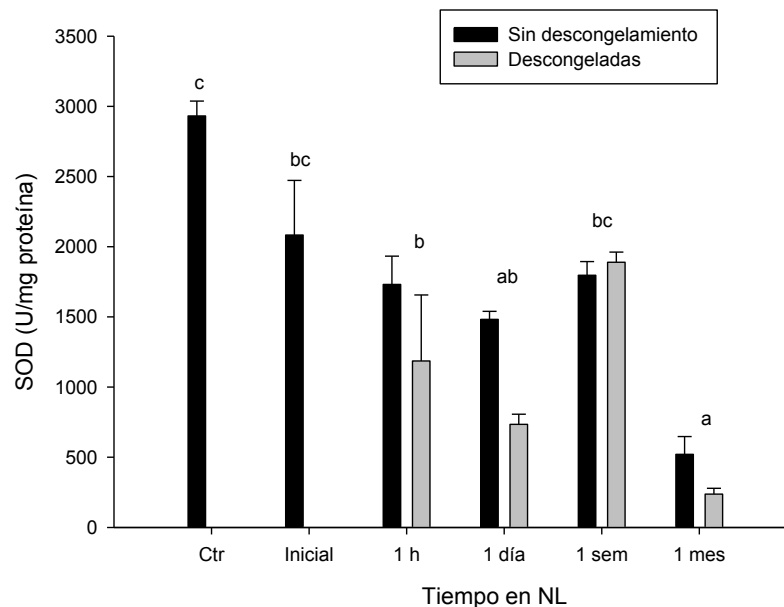


Figura 10. Actividad enzimática superóxido dismutasa (U/mg proteína) en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” crioconservadas. Donde: Ctr: yemas axilares sin ningún tratamiento, Inicial: unos segundos en NL, 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes de almacenamiento en NL. En color negro sin descongelamiento y en color gris con descongelamiento (38°C/3min). Las barras indican la media \pm error estándar. Las literales indican diferencias entre tratamientos de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

En las yemas vitrificadas (Fig. 11) la actividad de SOD también difiere por efecto del tiempo en NL ($P < 0.05$) y respecto al control se mostró un decremento en la actividad enzimática. En un proceso como el de vitrificación muchas son las consecuencias del impacto de este tipo de estrés, el principal es en el flujo de oxígeno en la cadena respiratoria, lo que resulta en un incremento en la producción de ROS. Al igual que para CAT, la actividad enzimática de SOD en yemas vitrificadas respecto a las crioconservadas muestran un decremento muy marcado al comparar la figura 10 y 11, haciendo evidente que la solución PVS2 disminuye el nivel de estrés celular, observándose en la reducción en la actividad enzimática.

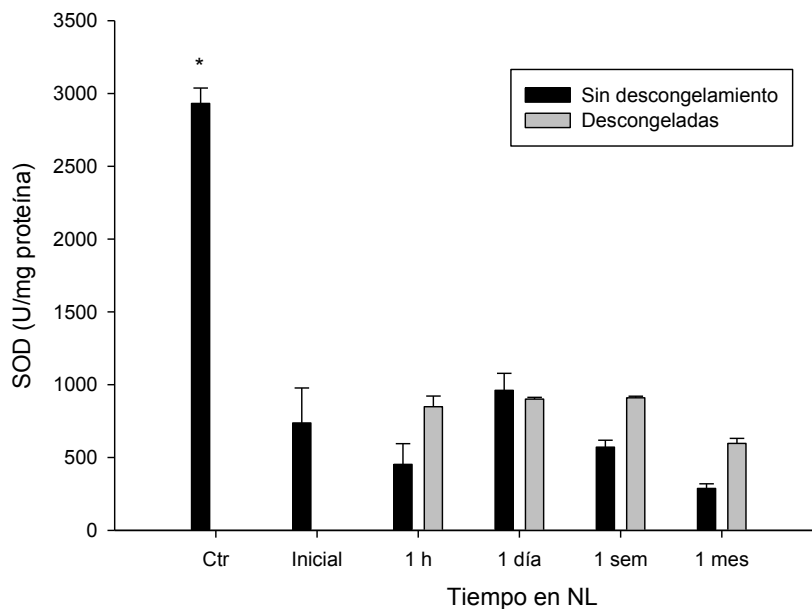


Figura 11. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) (U/mg proteína) en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” vitrificadas. Ctr: yemas sin ningún tratamiento, PVS2: después de incubación con el crioprotector (180 min), Inicial: unos segundos en NL, 1 hora, 1 día, 1 semana y 1 mes de almacenamiento en NL. En color negro son sin el proceso de descongelamiento y en color gris con descongelamiento (38°C/3min). Las barras indican la media \pm error estándar. El asterisco indica diferencia de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

Las enzimas CAT y SOD son consideradas enzimas clave para mantener las condiciones fisiológicas normales en respuesta al estrés oxidativo (Ashraf y Ali, 2008). En el proceso de crioconservación el grado de estrés producido en las yemas es considerable, debido al aumento en la actividad enzimática tanto para CAT como para SOD, en comparación con las vitrificadas, donde el uso de los crioprotectores ayudó a mantener la estabilidad normal de las células.

Peroxidación Lipídica

La cantidad de malondialdehído en yemas vitrificadas y crioconservadas a diferentes tiempos en NL se muestra en la figura 12. En la sección A, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las yemas vitrificadas y crioconservadas en el tiempo de A (una hora en NL) teniendo un valor mayor en las yemas vitrificadas ($0.11 \mu\text{mol.gr}^{-1}\text{pf}$) en contraste con las crioconservadas ($0.025 \mu\text{mol.gr}^{-1}\text{pf}$). En los demás tiempos de almacenamiento no se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre ellos.

En la sección B, se muestran los valores de MDA después del proceso de descongelamiento. Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las yemas vitrificadas y crioconservadas en el tiempo inicial (M2) y en un mes (D-). Sin embargo, en ambas secciones el contenido de MDA en yemas de vid no difiere significativamente ($P > 0.05$) respecto al tiempo de almacenamiento en NL, solamente un leve efecto en lo referente al uso o no de la solución de PVS2 en algunos tiempos de almacenamiento. Sin embargo en general se observa un aumento en el contenido en MDA en yemas vitrificadas, posiblemente por el efecto de deshidratación que se produce en las yemas, el cual causa una desbalance en las membranas celulares.

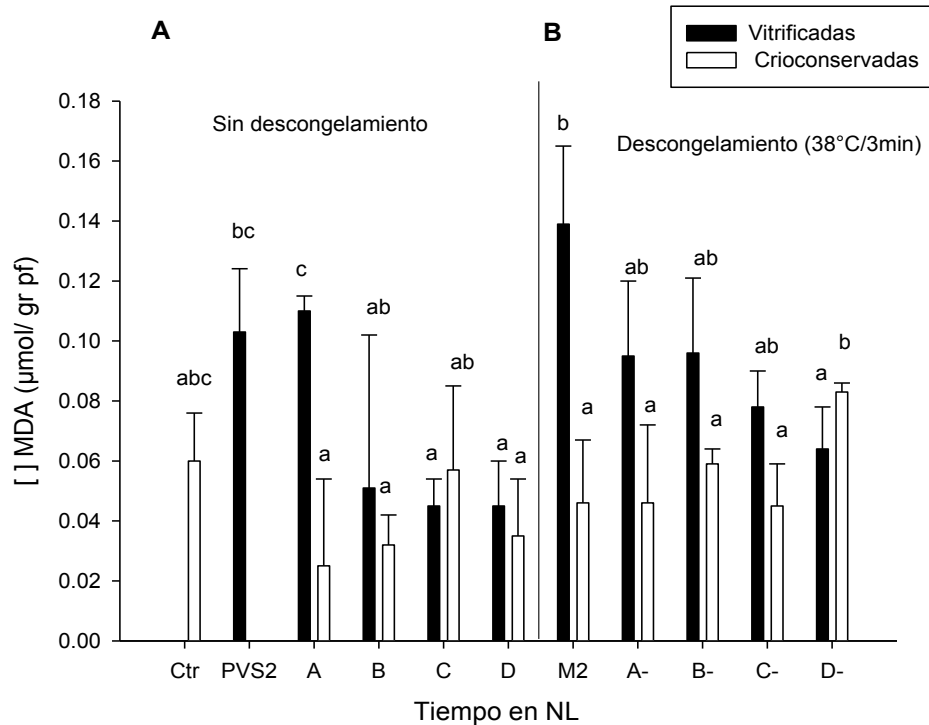


Figura 12. Cantidad de malondialdehído (MDA) ($\mu\text{mol}\cdot\text{gr}^{-1}$ peso fresco) en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservadas y vitrificadas a diferentes tiempos en nitrógeno líquido. Sección A: yemas sin el proceso de descongelamiento y Sección B: yemas con descongelamiento a $38^{\circ}\text{C}/3\text{min}$. Ctr: yemas sin ningún tratamiento, PVS2: después de 180 min de incubación con PVS2, M2: tiempo inicial (unos segundos en NL), A y A-: una hora en NL, B y B-: 24 horas en NL, C y C-: una semana en NL, D y D-: un mes en NL. Las barras indican la media \pm error estándar. Las medias con diferente letra indican diferencias de acuerdo con Tukey-kramer ($P < 0.05$).

En el presente estudio el proceso de vitrificación y crioconservación, así como la aplicación o no de calor para descongelar no tuvieron un impacto significativo en el grado de peroxidación lipídica comparado con los niveles basales o normales obtenidos en el control. Pudiendo aseverar que el proceso de vitrificación estadísticamente no tiene un impacto en la oxidación de los lípidos de membrana. Los datos de MDA fueron similares a los obtenidos por Lynch *et al.* (2011) en embriones somáticos de olivo, donde no encontraron diferencias significativas en los protocolos tanto de congelación como de pre-tratamientos de deshidratación; pero al igual que nuestros resultados encontraron una

tendencia a aumentar los niveles de producción de TBARS en los embriones que estuvieron en contacto con sacarosa, el cual es componente de la solución PVS2, tal vez la pérdida de turgencia celular debido a la deshidratación está fomentando la peroxidación lipídica.

Este comportamiento es semejante al reportado por Wen *et al.* (2010) en el cual encuentran un aumento en los valores de MDA tanto debido a la deshidratación como al congelamiento del tejido. Más aún, conforme el contenido de humedad disminuía el contenido de MDA en los embriones incrementaba progresivamente; pudiendo causar un efecto similar con las yemas vitrificadas. Como se mencionó anteriormente, la solución PVS2 causa deshidratación del tejido, el cual puede provocar la peroxidación. Tal como lo reporta Volk y Walters (2006) que el contenido de agua en brotes apicales disminuyó significativamente conforme aumentaron el tiempo de exposición con PVS2; e indiscutiblemente provoca un desequilibrio en los lípidos de membrana.

En contraste con nuestros datos en los resultados obtenidos por Benson *et al.* (1992) ellos encontraron un aumento en la cantidad de MDA en células de arroz congeladas en comparación con los controles, sugiriendo que el congelamiento causa daños que pueden promover la peroxidación lipídica. Sin embargo, el tejido utilizado en este trabajo (yemas axilares de vid) es bien sabido que es rico en polifenoles (Bravo y Saura-Calixto, 1998; Valiente *et al.*, 1995) los cuales pueden cumplir una función como sistema antioxidante y de esta forma mantener la estabilidad celular, debido a que la actividad de las principales antioxidantes SOD y CAT (Fig. 8 y 10) en las yemas crioconservadas disminuyó considerablemente respecto al tiempo de almacenamiento en NL. Sin embargo, estadísticamente en la mayoría de los tratamientos no se encontraron diferencias entre la vitrificación y la crioconservación en la cantidad de MDA producido.

Variabilidad Genética

De todos los 15 iniciadores probados, solamente OPE-03 y OPE-15 mostraron alteraciones en el perfil de fragmentos amplificados para comparar diferencias entre tratamientos. La figura 13 muestra la calidad e integridad del ADN genómico (ADNg) extraído de las yemas tratadas con los diferentes tiempos de almacenamiento en vitrificación y/o crioconservación. La flecha señala la posición en el gel observándose en un peso mayor a los 12,000 pb. Por otra parte en la tabla 4, se muestran las concentraciones del ADN que se utilizaron en los análisis moleculares. Las muestras que mostraron mejor calidad de ADNg fueron utilizadas para los análisis de RAPD.

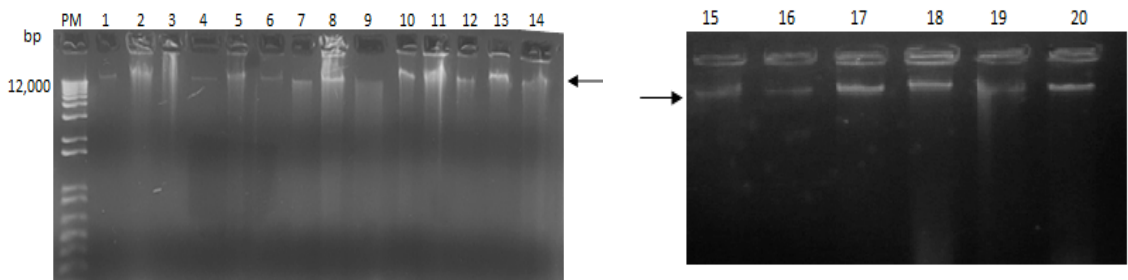


Figura 13. ADN genómico de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) tanto vitrificadas como crioconservadas, sin descongelarlas y descongeladas a 38°C/3 min. PM: marcador de peso molecular. Las flechas indican el ADNg de las muestras. Donde 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3: tiempo inicial, unos segundos en NL (V-M4), 4: tiempo inicial, unos segundos en NL (C-M4), 5: una hora en NL (V-M3), 6: una hora en NL (C-M3), 7: una hora en NL (V-M4), 8: una hora en NL (C-M4), 9: un día en NL (V-M3), 10: un día en NL (C-M3), 11: un día en NL (V-M4), 12: un día en NL (C-M4), 13: una semana en NL (V-M3), 14: una semana en NL (C-M3), 15: una semana en NL (V-M4), 16: una semana en NL (C-M4), 17: un mes en NL (V-M3), 18: un mes en NL (C-M3), 19: un mes en NL (V-M4) y 20: un mes en NL (C-M4).

Tabla 2. Concentración de ADNg (ng.µL⁻¹) de las diferentes muestras (1-20) de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservadas y vitrificadas utilizadas en el ensayo de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD).

ADNg	ng.µL ⁻¹	ADNg	ng.µL ⁻¹	ADNg	ng.µL ⁻¹	ADNg	ng.µL ⁻¹
1	129.7	6	97.1	11	144.4	16	70.7
2	169	7	209.5	12	210.9	17	559.9
3	94.3	8	285.6	13	223.39	18	408.6
4	421.2	9	48.3	14	59.8	19	564.9
5	172.1	10	92.2	15	106	20	411.6

Donde: vitrificadas (V) y crioconservadas (C), 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3: tiempo inicial, unos segundos en nitrógeno líquido (NL) (V-M4), 4: tiempo inicial, unos segundos en NL (C-M4), 5: una hora en NL (V-M3), 6: una hora en NL (C-M3), 7: una hora en NL (V-M4), 8: una hora en NL (C-M4), 9: un día en NL (V-M3), 10: un día en NL (C-M3), 11: un día en NL (V-M4), 12: un día en NL (C-M4), 13: una semana en NL (V-M3), 14: una semana en NL (C-M3), 15: una semana en NL (V-M4), 16: una semana en NL (C-M4), 17: un mes en NL (V-M3), 18: un mes en NL (C-M3), 19: un mes en NL (V-M4) y 20: un mes en NL (C-M4).

En la figura 14, se observa el perfil electroforético obtenido del ensayo de RAPD utilizando el iniciador OPE-03 en yemas tratadas a diferentes tiempos de almacenamiento en NL. En los tratamientos de crioconservación en los carriles 4C, 6C y 10C presentaron mayor número de fragmentos amplificados de 3, 6 y 5 respectivamente, con un tamaño de bandeo entre 100 y 500 pb, en comparación con el control (sin PVS2 y sin congelamiento en NL) que se encuentra en el carril 2C donde solo se obtuvo un fragmento amplificado de aproximadamente 100 pb.

Es importante mencionar que durante el almacenamiento en NL a los distintos tiempos (1 h, 1 día y 1 mes) se encontraron cambios en el patrón electroforético en los tejidos crioconservados (sin protección con PVS2) los cuales están en los carriles 4C, 6C y 10 C (Fig. 14). En los tejidos crioprottegidos con PVS2 el comportamiento con respecto al tiempo de almacenamiento en NL fue similar que los controles (carriles 1V y 1C), lo que sugiere que en dichos tratamientos no hubo modificaciones en el genoma. La única excepción fue con el tiempo de

almacenamiento de una semana, donde se obtuvieron 3 fragmentos en las yemas tratadas con vitrificación (carril 7V) de un tamaño aproximado de 100 a 300 pb.

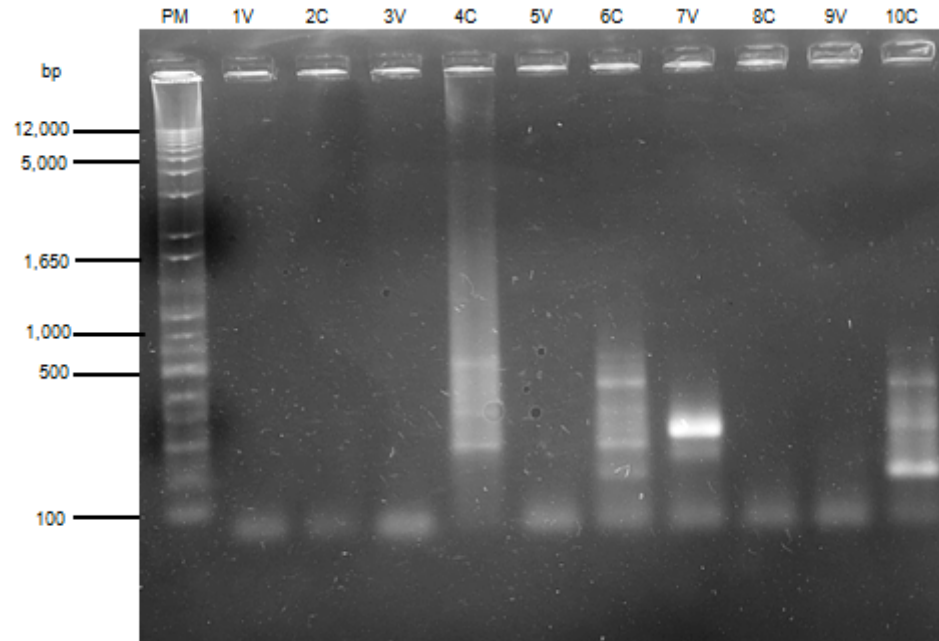


Figura 14. Amplificación mediante RAPD de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) vitrificadas (V) y crioconservadas (C). Amplificadas con el iniciador OPE-03. Donde PM: marcador de peso molecular, 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3 y 4: una hora en NL, 5 y 6: un día en NL, 7 y 8: una semana en NL, 9 y 10: un mes en NL.

En general se presentaron mayores alteraciones en los tratamientos crioconservados en comparación con los vitrificados; lo que sugiere un efecto protector de la aplicación de la solución PVS2 hacia el genoma. Se han mencionado diversos factores los cuales provocan daños en el ADN durante el proceso de crioconservación, uno de ellos es el daño mecánico al momento de la formación de hielo intra y extracelular (Lystsov y Moshkovsky, 1969; Kornilova *et al.*, 1996) lo cual se evita con la utilización de la solución PVS2, que cuenta con crioprotectores, los cuales interactúan con las moléculas de agua para evitar así la formación de cristales de hielo (Moges *et al.*, 2003).

Otro factor que se ha reportado como el principal en lo referente al daño del genoma, es el estrés oxidativo, donde se produce el principal radical que daña el ADN, que es el radical hidroxilo (OH⁻), que es neutralizado principalmente por el DMSO y la sacarosa que contiene la solución PVS2 (Smirnov y Cumbes, 1989; Miller y Cornwell, 1978). De acuerdo a esto, es poco probable que haya ocurrido una oxidación del ADN debido al efecto de los radicales libres. Datos similares a los aquí mostrados, los reportan Urbanová *et al.* (2006) crioconservando ápices de *Hypericum perforatum* L. y analizaron el genoma utilizando secuencias VNTR (por sus siglas en inglés: Variable Number Tandem Repeats) o microsatélites buscando alteraciones por efecto del proceso de crioconservación (congelamiento, almacenamiento en NL, descongelamiento y regeneración). Los autores observaron cambios en cuatro plantas regeneradas después de la crioconservación, mostrando ausencia y alteración en el tamaño del fragmento amplificado.

Por otra parte, en la figura 15 se muestran los fragmentos amplificados utilizando el iniciador OPE-03 mediante el ensayo de RAPD de yemas tanto crioconservadas como vitrificadas a diferentes tiempo en NL, las cuales fueron sometidas a calor para el proceso de descongelamiento (38°C/3 min). Se encontró que en las yemas vitrificadas en los tiempos de 1 hora (carril 5V), 1 día (carril 7V) y 1 mes (carril 11V) presentan entre 5 y 6 bandas; no observados sin la aplicación de calor (Fig.14). Por otra parte, los tejidos crioconservados por 1 hora (6C) y 1 día (8C) presentan un patrón de bandeo similar (3 bandas), a diferencia en lo detectado al mes de almacenamiento (carril 12C) en donde se observan 5 bandas con un tamaño de 100 a 500 pb. Estos cambios en el genoma en ambos tratamientos (vitrificación y crioconservación) no se presentaron en los controles (1V y 2C), lo cual sugiere que el descongelamiento aplicando calor altera el genoma de los tejidos crioconservados y vitrificados.

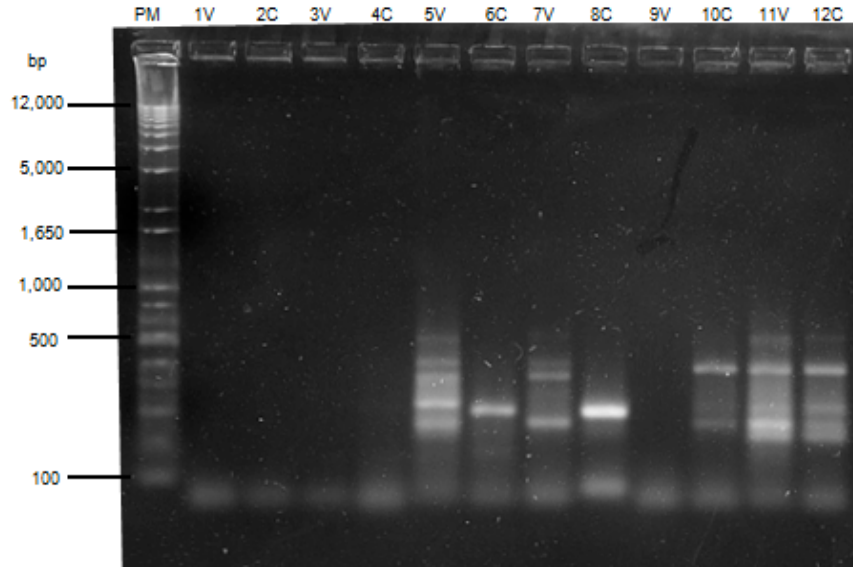


Figura 15. Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) vitrificadas (V), crioconservadas (C) y descongeladas a 38°C por 3min (M4). Amplificadas con el iniciador OPE-03. Donde PM: marcador de peso molecular, 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3 y 4: tiempo inicial, unos segundos en NL, 5 y 6: una hora en NL, 7 y 8: un día en NL, 9 y 10: una semana en NL, 11 y 12: un mes en NL.

En este contexto, si observamos las figuras 14 y 15 comparando las diferencias entre la aplicación de calor o no a las yemas después del almacenamiento en NL, se observa claramente como en las yemas vitrificadas sin la aplicación de calor en los carriles 3V, 5V y 9V (Fig. 14) muestran un fragmento (iguales al control) a diferencia con las bandas amplificadas en los carriles 5V, 7V y 11V (Fig. 15). Esto sugiere que de la aplicación de calor a las yemas en la descongelación tiene un efecto significativo en la variabilidad genética. Estos cambios genéticos se atribuyen principalmente a la formación del oxígeno singulete principalmente junto con otros ROS, al momento de la exposición al calor (Chernikov *et al.*, 2007). El oxígeno singulete es muy activo, en lo referente a la destrucción principalmente de la base guanosina del ADN y a una serie de aminoácidos (Chernikov *et al.*, 2007; Krasnovsky, 2003), ácidos nucleicos, membranas, proteínas y enzimas (Christofer *et al.*, 1984).

En la figura 16, se muestran los fragmentos amplificados utilizando el iniciador OPE-15 en yemas tratadas con vitrificación y crioconservación. Se detectó la presencia de cuatro bandas amplificadas para las yemas crioconservadas y almacenadas por una hora en NL (carril 4C), este patrón de bandeo no se observó después de un día de almacenamiento en NL (carril 6C) y después de un mes de almacenamiento (carril 10C) ya que no se detectaron bandas, comportándose de manera similar que el control (carril 2C). Esto indica que hay un cambio en el genoma sólo en las yemas crioconservadas y almacenadas por corto tiempo en NL. En los tejidos vitrificados se presenta una banda <100 pb en las yemas almacenadas por un día (carril 5V), una semana (carril 7V) y un mes (carril 9V), más no en tiempos cortos de una hora (carril 3V) y el control (1V), que posiblemente sea un bandeo debido a los remanentes del PCR.

Todo estos cambios detectados en el ADN, pueden estar en secuencias no codificantes del ADN las cuales no necesariamente están asociadas a alguna característica o función fisiológica, pero pueden indicar cierto grado de inestabilidad genética (Urbanová *et al.*, 2006), en este caso por crioconservación en NL por una hora. En la actualidad hay gran diversidad de técnicas moleculares para evaluar la estabilidad genética, como es el caso de RAPD; pero se encuentran restringidas debido a que evalúan sola una pequeña parte del genoma, es por ello necesario complementarlo con otro tipo de ensayos. Sin embargo, los cambios más importantes se dieron en los tratamientos de crioconservación, mientras que en las yemas tratadas con vitrificación no causaron ningún cambio en el genoma, comparadas con el control. En lo referente al tamaño y cantidad de bandas producidas, Maia *et al.* (2009) reportaron relaciones genéticas entre diversas variedades de vid y los perfiles electroforéticos con este iniciador, obtuvieron en promedio ocho fragmentos de un tamaño comprendido entre 3,000 y 500 pb en vid con el cv "Italia", sin embargo eso puede variar mucho entre cultivares, debido a que en este estudio observamos como máximo cinco fragmentos amplificados en el cultivar "Flame seedless".

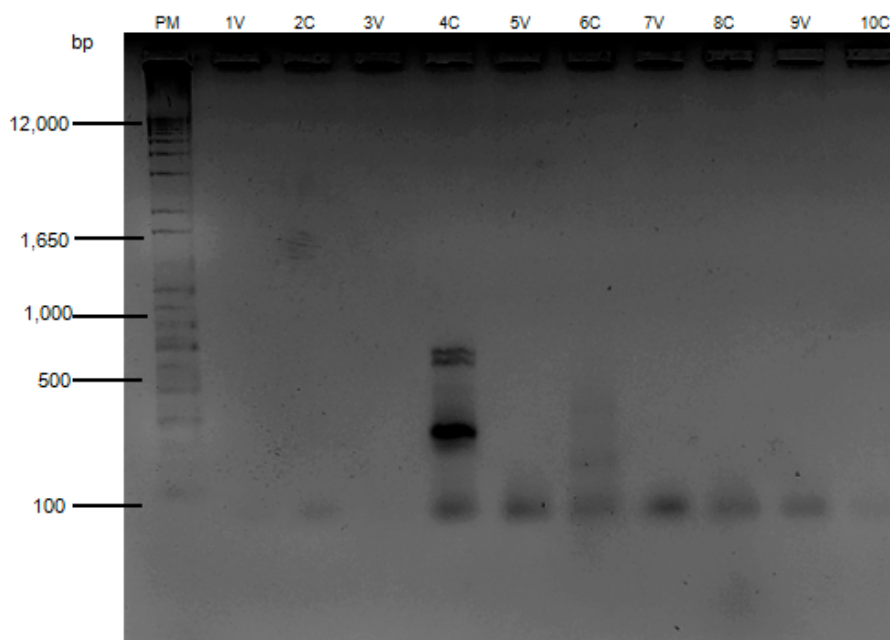


Figura 16. Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless” vitrificadas (V) y crioconservadas (C). Amplificadas con el cebador OPE-15. PM: marcador de peso molecular, 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3 y 4: una hora en NL, 5 y 6: un día en NL, 7 y 8: una semana en NL, 9 y 10: un mes en NL.

En la figura 17, se muestra la amplificación del iniciador OPM-03 en yemas vitrificadas y crioconservadas y descongeladas a 38°C por 3 min. En la mayoría de las muestras se detectó un fragmento amplificado menor de 100 pb, solamente en el tiempo de 1 hora crioconservado (carril 6C) y al mes en NL (carril 11V y 12C) no amplificaron ninguna banda. Infiriendo con base al gel que en esa parte que no hay cambios por efecto del descongelamiento.

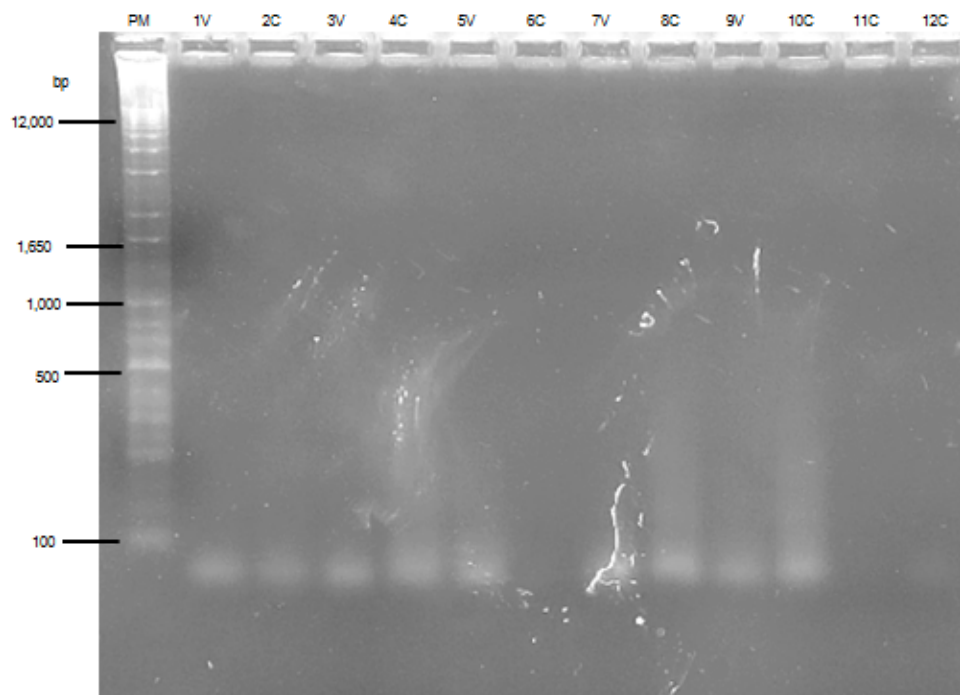


Figura 17. Amplificación mediante RAPD de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) vitrificadas (V), crioconservadas (C) y descongeladas a 38°C por 3 minutos (M4). Amplificadas con el cebador OPE-15. Donde PM: marcador de peso molecular, 1: después de 180 min en PVS2, 2: control sin PVS2, 3 y 4: tiempo inicial, unos segundos en NL, 5 y 6: una hora en NL, 7 y 8: un día en NL, 9 y 10: una semana en NL, 11 y 12: un mes en NL.

Los dos iniciadores que amplificaron fragmentos permitieron realizar el análisis a nivel molecular en las yemas tratadas mediante crioconservación y vitrificación y generaron diferente número de fragmentos según el tratamiento que se les aplicó (tabla 3 y 4). El número de fragmentos obtenidos por cada iniciador varió entre uno hasta seis bandas. En lo referente al tamaño de las bandas varió entre los 100 a 800 pb. El iniciador OPE-03 es el que generó mayor número de amplicones. En general tenemos un comportamiento donde se observan mayor cantidad de bandas en las yemas crioconservadas (sin PVS2), lo que nos indica que hay mayor variación genética en dicho tratamiento.

El proceso de vitrificación a nivel ADN no modificó su genoma comparado con los controles, lo cual es similar a lo encontrado por Channuntapipat *et al.* (2003) donde evaluaron la estabilidad genética en ápices de almendra vitrificados con PVS2 y almacenados durante 3 días en NL, con esta técnica de RAPD y no encontraron diferencias entre los perfiles amplificados respecto a los controles. Al igual a los datos obtenidos por Helliot *et al.* (1999) en meristemas crioconservados de *Prunus* y por Goto *et al.* (1998) con brotes micropropagados de *Pinus thunbergii*.

En contraste en la tabla 4, se muestra el efecto del descongelamiento en el genoma de las yemas de vid. Estos datos indican que el cambio brusco de temperaturas si tiene un efecto considerable en la estabilidad genética, y ocurrió mayor variación genética en yemas que no se pusieron en contacto con la solución PVS2. Sin embargo, con los resultados de este trabajo no es posible saber el tipo específico de cambios, ya sea inserciones, deleciones o cambios de un solo nucleótido, pero es probable que la secuencia de ADN en dichos tratamientos con respecto a los controles, como lo sugiere las alteraciones en los patrones de bandeo.

Tabla 3. Fragmentos polimórficos en vid crioconservada (C) y vitrificada-crioconservada (V) (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless”.

Iniciador	Número de fragmentos obtenidos por tratamiento											
	M1		M2		A		B		C		D	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
OPE-03	1	1	1	1	1	3	1	6	3	1	1	5
OPE-15	1	1	1	1	0	4	1	2	1	1	1	1
Total	2	2	2	2	1	7	2	8	4	2	2	6

NL: nitrógeno líquido, M1: después de la incubación por 180 min con (V) y sin (C) PVS2, M2: tiempo inicial (unos segundos en NL), A: una hora en NL, B: un día en NL, C: una semana en NL y D: un mes en NL.

Tabla 4. Fragmentos polimórficos en vid crioconservada (C) y vitrificada-crioconservada (V) (*Vitis vinifera* L.) cv “Flame seedless”. Con la aplicación de descongelamiento a 38°C por 3 minutos.

Iniciador	Número de fragmentos obtenidos por tratamiento											
	M1		M2		A		B		C		D	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
OPE-03	1	1	1	1	6	2	5	2	1	3	6	6
OPE-15	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
Total	2	2	2	2	7	2	6	3	2	4	6	6

NL: nitrógeno líquido, M1: después de la incubación por 180 min con (V) y sin (C) PVS2, M2: tiempo inicial (unos segundos en NL), A: una hora en NL, B: un día en NL, C: una semana en NL y D: un mes en NL.

Aún cuando observamos cambios en el genoma por efecto tanto de la crioconservación y descongelamiento, generalmente no se reportan cambios en la composición de los fragmentos de ADN después del congelamiento-descongelamiento. En el caso particular de vid Zhai *et al.* (2003) no encontraron diferencias en variabilidad genética entre las plantas crioconservadas y sus controles, determinado mediante RAPD. Al igual que en meristemas de algunas plantas como: cacahuate (*Arachis hipogea*) (Gagliardi *et al.*, 2003), abedul (*Betula pendula*) (Ryynänen y Aronen, 2005) y en papa (Harding y Benson, 2000) donde no se detectaron cambios en el genoma por efecto del proceso de crioconservación.

Sin embargo, existen pocos reportes referentes al estudio de cambios genéticos en plantas de vid crioconservadas, así como perfiles electroforéticos de los tejidos en las diversas etapas del protocolo de crioconservación (pre-tratamiento, crioprotectores, congelamiento y descongelamiento). La gran mayoría de los trabajos reportan no encontrar cambios a nivel genómico (Turner *et al.*, 2001b; Scocchi *et al.*, 2004; Zhai *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). Sin embargo, pocos reportes han detectado cambios al igual a este trabajo, como Ahuja *et al.* (2002) detectaron modificaciones en los perfiles amplificados mediante RAPD en una planta de *D. floribunda* después de la crioconservación. También De Verno *et al.* (1999) detectaron polimorfismos en el ADN y variaciones somaclonales entre las plantas regeneradas antes y después de la crioconservación. Sin embargo, las modificaciones genéticas debido a la crioconservación resulta ser aún muy controversial debido a que la mayoría de los análisis de variabilidad genética concluyen que no se presentan diferencias en el genoma de los tejidos.

VII. CONCLUSIÓN

El proceso de vitrificación en yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) del cultivar “Flame seedless” causó disminución en la actividad de SOD y CAT y aumento en la concentración de MDA y proteína total, en respuesta al estrés oxidativo ocasionado por este proceso. A nivel molecular no se detectaron cambios en la variabilidad genética por efecto de la vitrificación pero si por el proceso de crioconservación y al aplicar calor durante el descongelamiento; indicando que la vitrificación protege la integridad del genoma en las yemas axilares de vid.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AALPUM. (2012). Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa. [En línea]: Hermosillo, Sonora, México [Fecha de consulta: 10 abril, 2012], disponible en <<http://www.aalpum.com.mx/variedades.htm>>.
- Abdelnour A. (1999). Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 23:205-214.
- Adams L. K., Benson E. E., Staines H. J., Bremmer D. H., Millan S., Deighton N. (1999). Effect of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of *in vitro* plant cells. *Journal of Plant Physiology* 155:376-386.
- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105:121-126.
- Aebi H. (1987). Catalase of enzymatic analysis. Bergmeyer HU (ed): *Methods in Enzymology*, Weinheim VCH Verlagsgesellschaft. 3rd edit, Vol. 3 Enzymes 1: Oxidoreductase, transferases. 273–285 p.
- Ahuja S., Mandal B. B., Dixit S., Srivastava P. S. (2002). Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. *Plant Science* 163:971–977.
- Al-Ababneh S., Karam N. S., Shibli R. A. (2002) Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38:602–607.
- Al-Ababneh S., Shibli R., Karam N., Shatnawi M. A. (2003). Cryopreservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation-dehydration and vitrification. *Advanced HortScience* 17:15-20.
- Almanza P. J., Serrano P. A., Fischer G., Balaguera-López H. E. (2010). Rompimiento de la dormancia de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante aplicaciones de extracto de ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones del trópico alto. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 4:143-152.
- Alonso A., Queiroz C. S., Magalhães A. C. (1997). Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea Arabica* L.) seedlings. *Biochemical Biophysica Acta* 1323:75–84.

- Anchordoguy T. J., Rudolph A. S., Carpenter F. F., Crowe J. H. (1987). Modes of intereaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- Armstrong D. y Browne R. (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free radicals in diagnostic medicine* 366:43-58.
- Arreola-Cortés A., Castro-Mercado E., Lozoya-Gloria E., García-Pineda E. (2010). Aislamiento y caracterización de un ADNc que codifica para una superóxido dismutasa de frutos aguacate (*Persea americana* Mill. cv Hass) tratado por herida. *Ciencia Nicolaita No. Especial* 1:8.
- Ashmore S. (1997). Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Ashraf M. y Ali Q. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany* 63:266-273.
- Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G., Chae Y.A., Engelmann F. (2003) Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *Cryoletters* 24:389-396.
- Baghdadi S. H., Shibli R. A., Syouf M. Q., Shatnawai M. A., Arabiat A., Makhadmeh I. M. (2010) Cryopreservation by encapsulation-vitrification of embryogenic callus of wild Crocus (*Crocus hyemalis* and *Crocus moabiticus*). *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 6:436–443.
- Bannister J. V., Bannister W. H., Rotilio G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry* 22:111–180.
- Bauert M. R., Kälin M., Baltisberger M., Edwards P. J. (1998). No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. *Molecular Ecology* 7:1519-1527.
- Bekheet S. A., Taha H. S., Saker M. M., Solliman M. E. (2007). Application of cryopreservation technique for in vitro grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. *Journal of Applied Sciences Research* 3:859-866.
- Bender J. (2004). DNA methylation and epigenetics. *Annual Review of Plant Biology* 55:41-68.

- Berjak P. y Pammenter N. W. (2002). Orthodox and recalcitrant seeds. Tropical tree seed manual. Agricultural handbook 721:137-147.
- Benjak A., Ercisli S., Vokurka A., Maletic E., Pejic I. (2005). Genetic relationships among grapevine cultivars native to Croatia, Greece and Turkey. *Vitis* 44:73-77.
- Benson E. E. y Noronha-Dutra A. A. (1988). Chemiluminescence in cryopreserved plant tissue cultures: the possible involvement of singlet oxygen in cryoinjury. *Cryoletters* 9:120-131.
- Benson E. E. (1990). Free radical damage in stored plant germplasm. Bioversity International, IBPGR. Rome.
- Benson E. E., Lynch P. T., Jones J. (1992). Variation in free-radical damage in rice cell suspensions with different embryogenic potentials. *Planta* 188: 296-305.
- Benson E. E. (1994). Cryopreservation in plant cell culture: A practical approach. 2nd ed., González IRL Press, Oxford.147-167.
- Benson E.E., Lynch P.T., Jones J. (1995). The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Science* 110:249-258.
- Benson E. E. (1999). Cryopreservation. *Plant conservation biotechnology*. Taylor & Francis, London, 83-95.
- Benson E. E. y Bremner D. (2004). Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In *life in the frozen state*, Fuller, B.J., Lane, N. & Benson, E.E. (Eds.), CRC Press, ISBN 0-415-24700-4, Boca Raton, Florida. 206-241 p.
- Beyer Jr W. F. y Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161:559-566.
- Bowers J., Boursiquot J., This P., Chu K., Johansson H., Meredith C. (1999). Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of north eastern France. *Science*. 289:1562–1565.
- Bradford M. (1976). A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bravo L. y Saura-Calixto F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 135-141.

- Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchanan, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249 p.
- Buchanan F. C., Adams L. J., Littlejohn R. P. Maddox, J. F., Crawford A. M. (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22:397-403.
- Burdon R. H., O’Kane D., Fadzillah N., Gill V., Boyd P.A., Finch R. P. (1996). Oxidative stress and responses in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* subjected to chilling and salinity stress. *Biochemical Society Transactions* 24:468–472.
- Campos P., Vieira da Silva J., Pham Thi A. T. (1999). Effect of water stress on membrane integrity and enzymatic breakdown of galactolipids in *Vigna* sp. *Agronomia Lusitana* 47: 185–196.
- Chang Y. y Reed B. (2000). Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology* 40:311-322.
- Channuntapipat C., Sedgley M., Collins G. (2003). Changes in methylation and structure of DNA from almond tissues during *in vitro* culture and cryopreservation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:890-897.
- Charoensub R., Phansiri S., Sakai A., Yongmenitchai W. (1999). Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification. *Cryoletters* 20:89-94.
- Chernikov A. V., Gudkov S. V., Shtarkman I. N., Bruskov V. I. (2007). Oxygen effect in heat-induced DNA damage. *Biophysics* 52:185-190.
- Christofer S., Foote F., Shook C., Arbakerli R. B. (1984). Characterization of singlet oxygen. Ed. Lester Packer, *Methods in Enzymology*, Academic Press 105:36-47.
- Cho E. G., Hor Y. L., Kim H. H., Rao V. R., Engelmann F. (2002). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation-dehydration. *Cryoletters* 23:325-332.
- Cline S. D., Riggins J. N., Tornaletti S., Marnett L. J., Hanawalt P. C. (2004) Malondialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:7275-7280.

- Dat J., Vandenaabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:779-795.
- Davey M., Stals E., Panis B., Keulemans J., Swennen R. (2005). High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry* 347:201–207.
- Del Río D., Stewart A., Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases-Journal* 15:316–328.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. (1990) Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effect of previous cold hardening. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris Ser III* 310:317–323.
- De Verno L. L., Park Y. S, Bonga J. M., Barrett J. D. (1999). Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.) *Plant Cell Reports* 18:948-953.
- Dionisio-Sese M. L. y Tobita S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135:1-9.
- Dowgert M. F. y Steponkus P. L. (1984). Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle. *Plant Physiology* 75:1139-1151.
- Dumet D. y Benson E. E. (2000). The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm*, Italy, IPGRI.
- Dussert S., Mauro M. C., Deloire A., Hamon S., Engelmann F. (1991). Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: Influence of pretreatment, freezing and thawing conditions. *Cryoletters* 12:287-298.
- Engelmann F, Dument D., Chabrigillagne N., Abdelnour-Esquivel A., Assay-Bah B., Dereuddre J. y Duval Y. (1995). Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oilpalm embryos. *Plant Genetic Resources Newsletter* 103:27-31.
- Engelmann F. (1997). *In vitro* conservation methods. In: *Biotechnology and plant genetic resource* (eds). Collow, J. A., Ford-Loyd, B.V. and Newbury, H. J., Berlin. p. 119-161.

- Engelmann F. (2000). Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application, JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome, 8 p.
- Engelmann F. (2004). Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40:427-433.
- Esfandiari E., Shekari F., Shekari F., Esfandiari M. (2007). The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 35:48-56.
- Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. (1989). Continuous Monitoring of in Vitro Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. *Free Radical Research* 6:67-75.
- Esterbauer H. y Cheeseman K. (1990). Determination of aldehydic lipid-peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407-421.
- Esterbauer H., Schaur R., Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11:81-128.
- Fadzilla N. M., Finch R. H, Burdon R. H. (1997). Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany* 48:325-331.
- Fahy G., Macfarlane D., Angell C., Meryman H. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Fahy G., Levy D., Alis S. (1987). Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 196-213.
- Faloci M., Medina R., Olmos S., Scocchi A., Mroginski L. (2000). Análisis bioquímico y molecular de plantas crioconservadas de paraíso gigante (*Melia azedarach* L. var. gigantea). Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. (SGCyT). Resistencia, Chaco.
- FAOSTAT (2012). Dirección de Estadística [En línea]: Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Fecha de consulta: 28 marzo, 2012], disponible en <<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>>.
- Feierabend J., Schaan C., Hertwig B. (1992). Photoinactivation of catalase occurs under both high-and low-temperature stress conditions and

accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology* 100:1554-1561.

- Ferguson A. (1989). Genetic differences among brown trout (*Salmo trutta*) stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology* 21:35-64.
- Finnegan E., Peacock W., Dennis E. (2000). DNA methylation a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:217-223.
- Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 23:239-257.
- Fridovich I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58:61-97.
- Fu J. y Huang B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45:105-114.
- Fukai S., Goi M., Tanaka M. (1994). The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Scientia horticulturnae* 57: 347-351.
- Gagliardi R. F., Pacheco G. P., Carneiro L. A., Valls J. F. M., Vieira M. L. C., Mansur E. (2003). Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of in vitro-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants. *Cryoletters* 24:103-110.
- Ganino T., Silvanini A., Beghé D., Benelli C., Lambardi M., Fabbri A. (2012). Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum* 56:78-82.
- García-Águila L., de Feria M., Acosta K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* 7:67-79.
- González M. T., Ravelo M. M., Urra C., Martínez M. E., Engelmann F. (1998) Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apexes. *Cryoletters* 19:375-382.
- González-Arno M. T, Engelmann F. (2013). Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. San José, C.R.: IICA. ISBN 978-92-9248-446-0
- González-Benito M., Martín C., Vidal J. (2009). Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the spanish grapevine cultivars "Albariño" and "Tempranillo". *Vitis* 8:131-136.

- Goodman M. M., Stuber C. W., Newton K., Weissinger H. H. (1980). Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics* 96:697-710.
- Gordon-Kamm W. J. y Steponkus P. (1984). Lamellar-to-hexagonal II phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:6373-6377.
- Goto S., Thakur R. C., Ishii K. (1998). Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoot of *Pinus thunbergii* Parl. Using RAPD markers. *Plant Cell Reports* 18:193-197.
- Graudal L., Kjaer E., Thomden N., Larsen A. B. (1997). Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note N° 48. Danida Forest Seed Center.
- Gutha L. R., y Reddy A.R. (2008). Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 68:533-555.
- Guy C. y Haskell D. (1987). Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiology* 84:872-878.
- Hallerman E. M., y Beckmann J. S. (1988). DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45:1075-1087.
- Halliwell B. y Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 142:231-255.
- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C (2007). *Free radicals in biology and medicine* (Fourth edition), Oxford University Press Inc., Oxford.
- Hammond-Kosack K. E. y Jones J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hao Y., Liu Q., Deng X. (2001). Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels. *Cryobiology* 43:46-53.
- Hao Y., You C. X., Deng X. X. (2002) Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. *Cryoletters* 23:37-46.

- Harding K. (1991). Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55:141-146.
- Harding K. (1997). Stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* L. plants recovered from cryopreservation. *Cryoletters* 18:217-230.
- Harding K. y Benson E. E. (2000). Analysis of nuclear and chloroplast DNA in plants regenerated from cryopreserved shoot-tips of potato. *Cryoletters* 21:279-288.
- Harding K. y Benson E. E. (2001). The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* I. *in vitro* plantlets derived from cryopreserved germplasm. *Cryoletters* 22:199.
- Harding K. (2004). Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *Cryoletters* 25:3-22.
- Heath R. L. y Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125: 189–198.
- Helliot C. y Boucaud M. (1997) Effect of various parameters on the survival of cryopreserved *Prunus Ferlenain in vitro* plantlets shoot tips. *Cryoletters* 18:133-142.
- Helliot B., Madur D., Brison M., Dirlewanger E., De Boucaud M. (1999). Genetic stability analysis of cryopreserved *Prunus Ferlenain* rootstock by RAPD and AFLP. In *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Springer Netherlands. 249-250 p.
- Helliot B., Madur D., Dirlewanger E., de Boucaud M. T. (2002). Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38:493-500.
- Hernández J. A., Olmos E., Corpas F. J., Sevilla F., del Río L. A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105:151–167.
- Hidalgo L. (1999). *Tratado de viticultura General*. Segunda Edición. Ediciones mundi-prensa. Madrid, España. 85-161.
- Hiilovaara-Teijo M., Hannukkala A., Griffith M., Yu X. M., Pihakaski-Maunsbach, K. (1999). Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant physiology*, 121:665-674.
- Hipkiss A. R., Preston J. E., Himsworth D., Worthington V. C, Abbot N.J. (1997). Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity

- towards cultured rat brain endothelial cell. *Neuroscience Letters* 328:135-138.
- Hirai D., Shirai K., Sakai A. (1998). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101:109-115.
- Hirai D. y Sakai A. (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* 42:153-160.
- Hirai D. y Sakai A. (2000). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. En: Engelmann, F y Hiroko Takagi (ed). *Cryopreservation of tropical plant germplasm, current research progress and application*. JIRCAS/IPGRI, Rome 205-211 p.
- Huff D. R., Quinn J. A., Higgins B., Palazzo A. J. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. *Molecular Ecology* 7:1591-1597.
- Janero D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* 9:515-540.
- Janska A., Marsik P., Zelenkova S., Ovesna J. (2010) Cold stress and acclimation- what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology* 12:395-405.
- Japelaghi R. H., Haddad R., Garoosi G. A. (2011). Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular biotechnology* 49:129-137.
- Jaramillo S. y Baena M. (2000). Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- Johnston J. W., Harding K., Benson, E. E. (2007). Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. *Plant science* 172:524-534.
- Jouve L., Engelmann F., Noirot M., Charrier A. (1993) Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malondialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. *Plant Science* 91:109–116.

- Kaczmarczyk, A., Rokka, V., Keller, E. (2011) Potato shoot tip cryopreservation, a review. *Potato Research* 54:45-79.
- Karataş H. y Ağaoğlu Y. S. (2008). Genetic diversity among Turkish local grape accessions (*Vitis vinifera* L.) using RAPD markers. *Hereditas* 145:58-63.
- Kartha K. K., y Engelmann F. (1994). Cryopreservation and germplasm storage. In *Plant cell and tissue culture*. Springer Netherlands 195-230 p.
- Keller E. R. J., Grube M., Senula A. (2005). Crioconservación en el Banco de germoplasma de Gatersleben. Estado del arte en papa, ajo y menta. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. *Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible*. Resúmenes 15 p.
- Khalvati M., Bartha B., Dupigny A., Schröder P. (2010). Arbuscular mycorrhizal association is beneficial for growth and detoxification of xenobiotics of barley under drought stress. *Journal of Soils Sediments* 10:54-64.
- Kim H. J, Kato N., Kim S., Triplett B. (2008). Cu/Zn Superoxide dismutases in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form. *Planta* 228:281-292.
- Kobayashi T., Niino T., Kobayashi M. (2006). Cryopreservation of tobacco BY-2 suspension cell cultures by vitrification with encapsulation. *Plant Biotechnology* 23:333-337.
- Kocsis M., Jaromi L., Putnoky P., Kozma P., Borhidi A. (2005). Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. *Vitis* 44:87-91.
- Kornilova S. V., Leont'ev V. S., Grigor'ev D. N., Blagoi Y. P. (1996). Effect of low temperatures on molecular parameters of DNA. *Biofizika* 42:99-104.
- Kranner I., Birtic S., Anderson K. M, Pritchard H. W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death?. *Free Radical Biology and Medicine* 40:2155-2165.
- Krasnovsky A. A. (2003). Photodynamic activity and singlet oxygen. *Biofizika* 49:305-321.
- Kuiper J. P. C. (1985). Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Plant Physiology* 64:118–122.
- Langis R., Sohnabel B., Earle E. D. & Steponkus P. L. (1989). Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryoletters* 10:421-428.

- Langis R. y Steponkus P. L. (1991). Vitrification of isolated rye protoplasts: protection against dehydration injury by ethylene glycol. *Cryoletters* 12:107–112.
- Larkin P. y Scowcroft W. (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.
- Lazarow P. B. y Fujiki Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annual review of cell biology* 1:489-530.
- Leshem Y. (1987) Membrane phospholipid catabolism and Ca²⁺ activity in control of senescence. *Plant Physiology* 69:551–559.
- Lim S., Kim Y. H., Kim S.H., Kwon S.Y. and Lee H.S. (2007). Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling. *Molecular Breeding* 19:227-239.
- Lipavska H. y Vreugdenhil D. (1996). Uptake of mannitol from media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 45: 103-107.
- Liu Y., Wang X., Liu L. (2004). Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *Plant science* 166:677-685.
- López C. M. R., Wetten A. C., Wilkinson M. J. (2004). Detection and quantification of in vitro-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* (L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110:157-166.
- Lynch D. V. y Steponkus P. L. (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* 83:761-767.
- Lynch P. T., Siddika A., Johnston J. W., Trigwell S. M., Mehra A., Benelli C., Lambardi M., Benson E. E. (2011). Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science* 181:47-56.
- Lyons J. M. y Asmundson C. M. (1965). Solidification of saturated/unsaturated fatty acid mixtures and its relationship to chilling sensitivity in plants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 42:1056-1058.
- Lyons J. M. y Ralson J. K. (1970). Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiology* 45:386-389.

- Lystsov V. N. y Moshkovsky Y. S. (1969). DNA cryolysis. *Biochimica et Biophysica Acta-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 190:101-110.
- Magill W., Deighton N., Pritchard H.W., Benson E.E., Goodman B.A. (1994). Physiological and biochemical studies of seed storage parameters in *Carica papaya*. in *Oxygen and Environmental Stress in Plants*, Vol 102 (R. Walting and J.A. Allen, eds.). The Royal Society of Edinburgh, Scotland. 439–442 p.
- Maia S. H. Z., Mangolin C. A., Collet S. A. O., Machado M. F. P. S. (2009). Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera*) cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA. *Genetics and Molecular Research* 8:28-38.
- Margesin R., Neuner G., Storey K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94:77-99.
- Markert C. y Moller L. F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 45: 753-763.
- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25:19-23.
- Marnette L. J. (1994) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424:83-95.
- Marnette L. J. (1999) Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer and Metastasis Reviews* 13:303-308.
- Martínez F. (1991). *Biología de la vid. Fundamentos biológicos de la viticultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Martínez-Montero, M. E., Martínez J., Castillo R., Engelmann F., González-Arnao M. T. (2005). Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) apices and calluses. *Acta Horticulturae* 666:127-131.
- Matsumoto T., Sakai A., Takahashi C., Yamada K. (1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryoletters* 16:189-196.
- Matsumoto T. y Sakai A. (2003). Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica* 131:299-304.

- McCord J. M, y Fridovich I. (1969). Superoxide Dismutase, an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). The Journal of Biological Chemistry 244:6049-6055.
- Miller J. S. y Cornwell D. G. (1978). The role of cryoprotective agents as hydroxyl radical scavengers. Cryobiology, 15:585-588.
- Mishra N. P., Mishra R. K., Singhal G. S. (1993). Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. Plant physiology 102:903-910.
- Moazami-Goudarzi K., Furet J. P., Grosclaude F., Laloë D. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. Animal genetics, 28:338-345.
- Moges A., Karam N., Shibli R. (2003). Slow Growth *in vitro* preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. Advanced HortScience. 17:1-8.
- Mot R. D., Schoofs G., Nagy I. (2007). Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress responsive proteins. Archives of Microbiology 188:257-271.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25:239-250.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15:473-479.
- Nag K. K. y Street H. E. (1973). Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature 245:270-272.
- Nair V. y Turner G.A. (1984). The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. Lipids 19:804-805.
- Nair D. S. y Reghunath B. R. (2009). Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation-dehydration technique. In vitro cellular and developmental biology-plant 45:565-573.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of experimental botany 53:1237-1247.
- Nieves V., Conchi S., Lorena J., Antonio B., Ana M. V. (2005). Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant 41:63-68.

- Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matuzawa T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91:67-73.
- Novitskaya G. V., Kocheshkova T. K., Feofilaktova T. V., Novitskii Y. I. (2004). Effect of choline chloride on the lipid content and composition in the leaves of principal magnetically-oriented radish types. *Russian Journal of Plant Physiology* 51:361-371.
- Palombi M., y Damiano C. (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* 20:1061-1066.
- Pandey D. M., Wu R. Z., Hahn E. J., Paek K. Y. (2006). Drought effect on electrophoretic protein pattern of *Anoectochilus formosanus*. *Scientia horticulturae* 107:205-209.
- Panis B., Swennen R., Engelmann F. (2001). Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae* 650:79-86.
- Pennycooke J. y Towill L. (2000). Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports* 19:733-737.
- Peredo E. L., Arroyo-García R., Reed B. M., Revilla M. (2008). Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57:234-241.
- Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation biology*, 12:844-855.
- Piñero D., Barahona A., Eguarte L., Rocha-Olivares A., Salas-Lizana R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México, 415-435.
- Polle A. (1996). Protection from oxidative stress in trees as affected by elevated CO₂ and environmental stress. In 'Terrestrial ecosystem response to elevated carbon dioxide'. (Eds G Koch and H Mooney) Academic Press: New York. 299–315 p.
- Poobathy R., Sinniah U. R., Xavier R., Subramaniam S. (2013). Catalase and superoxide dismutase activities and the total protein content of protocorm-like bodies of *Dendrobium* Sonia-28 subjected to vitrification. *Applied Biochemistry Biotechnology* 170:1066-1079.
- Quatrano R. S. (1968). Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiology* 43:2057-2061.

- Queiroz C. G., Alonso A., Mares-Guia M., Magalhães A. C. (1998). Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biology Plant* 41:403–413.
- Rahman M., y Rajora O. (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports* 20:531-536.
- Ramalho J. C., Campos P. S., Teixeira M., Nunes M. A. (1998). Nitrogen dependent improvement of antioxidant systems and changes in lipid composition of chloroplast membranes in *Coffea arabica* plants submitted to high irradiance. *Plant Science* 135:115–124.
- Ramírez-Serrano R., Larrinaga-Mayoral J., Murillo-Amador B., Hernández-Saavedra N., Fujiyama H. (2008) Respuesta antioxidante enzimática en frutos de chile ancho (*capsicum annum* l.) bajo condiciones de estrés salino. *Interciencia* 33: 377-383.
- Razdan M. y Cockling E. (1997). Biotechnology in conservation of genetic resources. In *Conservation of Plant Genetic Resources in vitro* 125 p.
- Reed B. M. (1990). Survival of *in vitro*-grown apical meristems of pyrus following cryopreservation. *HortScience* 25:111-113.
- Reed B. M. (1995). Cryopreservation of *in vitro*-grown gooseberry and currant meristems. *Cryoletters* 16:131-136.
- Reed B. M. (2008). *Plant cryopreservation: a practical guide*. Ed. Springer.
- Reinoud P., Schrijnemakers E., Iren F., Kijne J. (1995). Vitrification and a heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 261-267.
- Roach T., Ivanova M., Beckett R. P., Minibayeva F. V., Green I., Pritchard H. W., Kranner I. (2008). An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia plantarum* 133:131-139.
- Robertson L., Magill W. J., Benson E. E., Bremner D. H., Buultjens T. E. (1995). Oxidative stress in the plant tissue culture environment. *Biochemical Society Transactions* 23: 263S.
- Royo J. B. e Itoiz R. (2004). Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and the congruence among classifications. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:153-160.

- Ryynänen L. (1998). Effect of Abscisic Acid, Cold Hardening, and Photoperiod on Recovery of Cryopreserved *in Vitro* Shoot Tips of Silver Birch. *Cryobiology* 36:32-39.
- Ryynänen L. y Aronen T. (2005). Genome fidelity during short-and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant cell, tissue and organ culture* 83:21-32.
- Sakai A. (1960). Survival of the twigs of woody plants at -196°C. *Nature* 185:392-394.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1991). Survival by vitrification of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *basiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Journal of Plant Physiology*. 137:465-470.
- Saker M. M., Bekheet S. A., Taha H. S., Fahmy A. S., Moursy H. A. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia Plantarum* 43: 347-351.
- Salunke D. y Kadam S. (1995). Handbook of fruit science and technology production, composition, storage and processing. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EEUU 7-38 p.
- Scocchi A., Faloci M., Medina R., Olmos S., Mroginski L. (2004). Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica* 135:29-38.
- Sevilla C. L., Mahle N. H., Eliezer N., Uzieblo A., O'Hara S. M., Nokubo M., Miller R., Rouzer C. A., Marnett L. J. (1997) Development of monoclonal antibodies to the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone. *Chemical Research in Toxicology* 10:172-180.
- Shah K., Kumar R. G., Verma S., Dubey R.S. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161:1135-1144.
- Sharaf S. A., Shibli R. A., Kasrawi M. A., Baghdadi S. H. (2012). Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:437-444.

- Shatnawi M., Engelmann F., Frattarelli A., Damaino C. (1999). Cryopreservation of apices *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Cryoletters* 20:13-20.
- Shatnawi M. A., Shibli R. A., Abu-Romman S. M., Al-Mazra'awi M. S., Al Ajlouni Z. I., Shatanawi W. A., Odeh W. H. (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9:213-220.
- Shibli R. (2000). Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. *Cryoletters* 21:39-46.
- Shibli R., Smith M., Shatnawi M. (1999). Pigment recovery from encapsulated-dehydrated *Vaccinium pahalae* (ohelo) cryopreserved cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55:119-123.
- SIAP (2012). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [En línea]: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. [Fecha de consulta: 2 mayo, 2012], disponible en <www.siap.gob.mx>.
- Singh M., Chaudhary K., Singal H. R., Magill C. W., Boora K. S. (2006). Identification and characterization of RAPD and SCAR markers linked to anthracnose resistance gene in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Euphytica* 149:179-187.
- Smirnoff N. y Cumbes Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28:1057-1060.
- Sosa-Luría D., Chávez-Servia J. L., Mondragón-Chaparro D., Estrada-Gómez J. A., Ramírez-Vallejo P. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de seis especies de *Tillandsia* (*bromeliaceae*) de Oaxaca, México. *Revista fitotecnica mexicana* 35:37-42.
- Steponkus P. y Lanphear F. (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology* 42:1423-1426.
- Stuber C. W. (1988). Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical bulletin/North Carolina Agricultural Research Service 286.
- Surenciski M., Dematteis M., Flachsland E. (2007). Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (*Orchidaceae*). *Annales Botanici Fennici* 44: 287-292.
- Swan T., Deakin E., Hunjan G., Souch G., Spencer M., Stafford A., Lynch P. (1998). Cryopreservation of cell suspensions of *Polygonum aviculare* using traditional controlled rate freezing and encapsulation/dehydration

- protocols, a comparison of post-thaw cell recovery. *Cryoletters* 19:237-248.
- Swan T., O'hare D., Gill R., Lynch P. (1999). Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension cultures of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Cryoletters* 20:325-336.
- Tammam, A. A., Abou Alhamd M. F., Hemeda, M. M. (2008). Study of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Banysoif 1. *Australian Journal of Crop Science* 1:115-125.
- Tanksley S. D. y Rick C. (1980). Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 58:161-170.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu B., Popova L. P. (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry* 67:710-715.
- Taylor A. O., Slack C. R., McPherson H. G. (1974). Plants under climatic stress VI chilling and light effect on photosynthetic enzymes of sorghum and maize. *Plant Physiology* 54:696–701.
- Terral J. (2002). Quantitative anatomical criteria for discriminating wild grapevine (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) from cultivated vines (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*). *British Archaeological Reports* 1063: 59–64.
- Thi A. P., Sidibé-Andrieu M. D., Zuily-Fodil Y., da Silva J. V. (1989). Effects of low temperature on lipid and fatty acid composition of sorghum roots and shoots. In Springer US, *Biological Role of Plant Lipids* 555-558.
- Tolbert N. E. (1981). Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annual review of biochemistry* 50:133-157.
- Touchell D., Chiang V., Tsai C. (2002). Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Reports* 21:118-124.
- Towill L. E. y Bajaj Y. P. S. (2002). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 50, Cryopreservation of plant germplasm II. Springer Verlag, Berlin.
- Tsai S. F., Yeh S. D., Chan C. F., Liaw S. I. (2009). High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 98:157–164.

- Turner S., Senaratna T., Bunn E., Tan B., Dixon K. W., Touchell D. H. (2001)a. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals Botany-London* 87:371-378.
- Turner S., Krauss S. L., Bunn E., Senaratna T., Dixon K., Tan B., Touchell, D. (2001)b. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Science*161:1099-1106.
- Uragami A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T. (1989). Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8:418-421.
- Uragami A., Sakai A., Nagal M. (1990). Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports* 9:328-331.
- Urbanová M., Košuth J., Čellárová E. (2006). Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. *Plant cell reports* 25:140-147.
- Valiente C., Arrigoni E., Esteban R. M., Amado R. (1995). Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of food science* 60:818-820.
- Villalobos V. y Engelmann F. (1995). *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:375-382.
- Volk, G. M. y Walters C. (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology* 52:48-61.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van De Lee T., Hornes M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23:4407-4414.
- Vos P. y Kuiper M. (1997). AFLP analysis. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Wiley-VCH, New York 115-131.
- Vranova E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53:1227-1236.
- Wang Q., Tanne E., Arav A., Gafny R. (2000). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:41-46.
- Wang Q., Gafny R., Sahar N., Sela I., Mawassi M., Tanne E., Perl A. (2002) Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell

- suspension by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science* 162:551-558.
- Wang Q., Mawassi M., Sahar N., Li P., Colova-Tsolova V., Gafny R., Sela I., Tane E., Perl A. (2004). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspension by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:267-275.
- Wen B., Wang R., Cheng H., Song S. (2010). Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. *Protoplasma* 239:57-67.
- Wright M. y Simon E. W. (1973). Chilling injury in cucurnber leaves. *Journal of Experimental Botany* 79:400-411.
- Wu Y., Engelmann F., Zhao Y., Zhou M., Chen S. (1999). Cryopreservation techniques and conditioning of donor plants. *Cryoletters* 20:121-130.
- Yagi K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology* 108:101-106.
- Yamauchi Y., Furutera A., Seki K., Toyoda Y., Tanaka K., Sugimoto Y. (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:786–793.
- Zarghami R., Pirseyedi M., Hasrak S., Sardrood B. P. (2008). Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Solanum tuberosum*. *African Journal of Biotechnology* 7:16.
- Zhai Z., Wu Y., Engelmann F., Chen R., Zhao Y. (2003) Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *Cryoletters* 24:315-322.
- Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Zhang D., Chen S. (1999). Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. *Cryoletters* 20:103-108.
- Zhao C., Wu Y., Engelmann F., Zhou M. (2001). Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *Cryoletters* 22: 321-8.
- Zhao M., Dhital S. P., Fang Y., Khu D., Song Y., Park E., Lim, H. (2005). Application of slow-freezing cryopreservation method for the conservation of diverse potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *Journal of Plant Biotechnology* 7:183.
- Zhu G., Geuns J., Dussert S., Swennen R., 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 128:80-94.