



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

**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE  
GENES QUE CODIFICAN PARA ADN  
METILTRANSFERASAS EN EMBRIONES DE  
UVA (*Vitis vinifera*) cv. RED GLOBE  
CRIOCONSERVADOS**

---

Por:

**Q.F.B. HERIBERTO GARCÍA CORONADO**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Heriberto García Coronado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




---

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández  
Director de Tesis




---

Dra. Marisela Rivera Domínguez  
Asesora



---

Dra. Rosalba Troncoso Rojas  
Asesora



---

Dra. María Elena Báez Flores  
Asesora

## 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**

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

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

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

A la Dra. Marisela Rivera Domínguez por el valioso tiempo, conocimiento y apoyo económico brindado. Por la facilitación de equipos y reactivos y por permitirme el acceso a su laboratorio como un miembro más.

A la Dra. Rosalba Troncoso Rojas por los consejos, enseñanzas y conocimiento transmitido. Por su siempre amable disposición de tiempo, equipos, reactivos y acceso a su laboratorio.

A la Dra. María Elena Báez Flores por estar siempre al pendiente de la realización de este proyecto y la culminación de mis estudios de maestría a pesar de la distancia.

Especialmente, al Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández por darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección. Por creer en mí y mostrarme la verdadera esencia del quehacer científico. Por el conocimiento transmitido, el apoyo económico y su valioso tiempo brindado.

Al M.C. Alberto Sánchez por el apoyo técnico, las asesorías y la facilitación de equipos y reactivos.

A las doctoras Silvia Moya y Marisela Montalvo por permitirme el acceso a su laboratorio como un miembro más, por el soporte técnico y la facilitación de equipos.

De igual forma a las doctoras María Auxiliadora Islas y Carmen Contreras por la facilitación de equipos y reactivos que fueron de gran utilidad para la realización de este proyecto.

A los miembros, compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Plantas, por el soporte técnico, compañerismo y apoyo. Alexel, Alhelí Ochoa, Eduardo Trillo, Guillermo Berumen, Javier Ojeda, Julio Tafolla, Miguel Hernández y Rigel Fernández.

A mis amigos de generación de maestría: Dulce Oney Román, Luisana Guirado, Cinthya Ruiz, Alejandra Chávez y David Encinas.

Muchas gracias a todos.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres y hermana,  
por su incondicional apoyo y ejemplo  
durante mi preparación profesional  
y camino por la vida.*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Cuadros.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes</b> .....	<b>6</b>
II.I El Cultivo de Vid en Sonora.....	6
II.II Conservación de Germoplasma.....	7
II.II.I Conservación <i>in situ</i> .....	7
II.II.II Conservación <i>ex situ</i> .....	8
II.II.II.I Bancos de semillas.....	9
II.II.II.II. Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
II.II.II.III Crioconservación.....	10
II.III. Crioconservación por Vitricación.....	12
II.IV. Conservación de Germoplasma de Vid.....	14
II.IV.I Bancos de Germoplasma de Vid a Nivel Mundial y Nacional.....	14
II.IV.II. Crioconservación por Vitricación en <i>Vitis vinifera</i> .....	16
II.V. Modificaciones Moleculares Producidas por la Crioconservación y la Manipulación <i>in vitro</i> de Plantas.....	17
II.V.I Modificaciones Genéticas.....	18
II.V.II Alteraciones Epigenéticas.....	22
II.VI. Cambios en la Metilación de ADN de Plantas Debidos a la Crioconservación.....	24
II. VII. Participación de las ADN Metiltransferasas en las Modificaciones Epigenéticas en Plantas y su Regulación en la Crioconservación por Vitricación.....	27
<b>III. Hipótesis</b> .....	<b>31</b>
<b>IV. Objetivos</b> .....	<b>32</b>
IV.I. Objetivo General.....	32
IV.II Objetivos Específicos.....	32
<b>V. Materiales y Métodos</b> .....	<b>33</b>
V.I Establecimiento del Protocolo de Crioconservación por Vitricación.....	33
V.I.I Material Vegetal.....	33
V.I.II. Vitricación y Crioconservación.....	33
V.I.III. Análisis de Viabilidad.....	35
V.I.VI. Regeneración de Plántulas.....	35
V.II. Aislamiento de Fragmentos de Genes Codificando Enzimas ADNMET.....	36
V.II.I. Diseño de Oligonucleótidos.....	36
V.II.II. Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc.....	37

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
V.II.III. Amplificación, Secuenciación y Análisis a Nivel de Aminoácidos.....	<b>38</b>
V.III. Análisis de Expresión de Genes Codificando Para Enzimas ADNMET.....	<b>38</b>
V.III.I. Extracción de ARN Total y Diseño de Oligonucleótidos.....	<b>38</b>
V.III.II. Cuantificación de Expresión de Transcritos Codificando ADNMET.....	<b>39</b>
V.VI. Análisis Estadístico.....	<b>40</b>
<b>VI. Resultados y Discusión.....</b>	<b>41</b>
VI.I. Efecto de la Vitricación y Crioconservación Sobre la Viabilidad.....	<b>41</b>
VI.II Efecto de la Vitricación y Crioconservación Sobre el Desarrollo del Embrión.....	<b>47</b>
VI.III. Transcritos Codificando ADNMET.....	<b>52</b>
VI.IV. Efecto de la Vitricación y Crioconservación Sobre la Expresión de Transcritos Codificando ADNMET.....	<b>55</b>
<b>VII. Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>VIII. Perspectivas.....</b>	<b>68</b>
Bibliografía.....	<b>69</b>



## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de embriones cigóticos de uva.	43
2	Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad de embriones cigóticos de uva.	45
3	Embrión cigótico en fase cotiledonar mostrando la tinción característica de la reducción de sales de TTC.	46
4	Efecto de la vitrificación sobre el desarrollo de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> .	48
5	Regeneración de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> vitrificados y crioconservados	49
6	Efecto de la vitrificación y crioconservación sobre el desarrollo de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> .	50
7	Análisis de ARN y ADNc por electroforesis en gel de agarosa.	53
8	Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADNc codificando presuntamente ADNMET's.	54
9	Análisis electroforético de ARN total de embriones cigóticos crioconservados por vitrificación.	56
10	Validación del análisis de expresión relativa $\Delta\Delta C_t$ por curva estándar.	57
11	Análisis de la expresión de genes parciales <i>MET1-2</i> en embriones de <i>V. vinifera</i> crioconservados por vitrificación.	59
12	Análisis de la expresión de genes parciales <i>DRM1</i> en embriones de <i>V. vinifera</i> crioconservados por vitrificación.	62

## LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>		<b>Página</b>
1	Descripción de las condiciones utilizadas para cada uno de los tratamientos de vitrificación evaluados.	34
2	Oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de ADNc codificando ADNMET's de embriones cigóticos de <i>V. vinifera</i> .	37
3	Oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión de los genes parciales codificando ADNMET's y para el gene endógeno utilizado para normalizar.	40
4	Características de los oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de ADNc codificando presuntamente ADNMET's.	52
5	Condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos de ADNc codificando presuntamente ADNMET's.	54
6	Resultados del alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de los SETIS.	55

## RESUMEN

México es uno de los principales productores de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) a nivel mundial, siendo el estado de Sonora el mayor productor en nuestro país. Debido a esto, es importante utilizar protocolos para mantener el germoplasma de las variedades de uva de mesa. La crioconservación por vitrificación es una alternativa viable. Sin embargo, este procedimiento puede inducir cambios en la metilación del ADN debido a la actividad de las enzimas 5-citosina ADN metiltransferasas (ADNMET's), y consecuentemente alteraciones fenotípicas. El presente estudio tuvo como objetivo diseñar un protocolo para la crioconservación por vitrificación de embriones cigóticos de *V. vinifera* cv. 'Red Globe' y evaluar el efecto del tratamiento sobre la expresión de genes codificando ADNMET's. Se diseñaron tratamientos de vitrificación y crioconservación utilizando la solución de vitrificación de plantas 2 (PVS2) y nitrógeno líquido (NL), en donde se evaluó el efecto del tiempo de inmersión en PVS2 y en NL sobre la viabilidad de los embriones evaluada mediante el desarrollo del embrión o reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). Se creó una genoteca de expresión de embriones cigóticos de uva para identificar secuencias de expresión etiquetadas (SETIS) de genes codificando ADNMET's. Se analizó la expresión de SETIS de ADNMET's mediante cuantificación por transcriptasa reversa reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qTR-RCP). Se observó reducción en la viabilidad de los embriones con el aumento en el tiempo de inmersión en la solución de PVS2 y NL evaluada mediante TTC. Las condiciones óptimas de vitrificación fueron 10 minutos en PVS2 al 50% a 25 °C seguido por 10 minutos en PVS2 al 100% a 4 °C. Mediante estas condiciones, fue posible inducir el desarrollo en el 30% de los embriones tratados después de una inmersión en NL durante 30 minutos. Se lograron amplificar y secuenciar dos SETIS de la familia 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados (DRM), dos SETIS de la familia 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1 (MET1) y un SETI de la familia de 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina (CMT). Se registraron alteraciones en la expresión de uno de los genes que codifican ya sea para MET1 o DRM debido al tratamiento de crioconservación por vitrificación mediante qTR-RCP. Se concluye que los genes analizados son parte del

mecanismo de regulación epigenética y que posiblemente los tratamientos de vitrificación y crioconservación alteran el patrón de metilación del ADN en embriones cigóticos de uva.

**Palabras clave:** *Vitis vinifera*, embrión cigótico, crioconservación, vitrificación, ADN metiltransferasa.

## ABSTRACT

Mexico is one of the main producers of table grape (*Vitis vinifera*) worldwide, being the Sonora state the largest producer within the country. Because of that, it is important to carry out protocols aimed to maintain the table grape varieties germplasm. The cryopreservation by vitrification is a viable alternative. However, it is known that this procedure can induce changes in the DNA methylation due to the activity of 5-cytosine DNA methyltransferases enzymes (DNAMET's) which, in turn, can induce phenotypic changes. The objective of the present study was to design a protocol for the cryoconservation by vitrification of zygotic embryos of *V. vinifera* cv. 'Red Globe' and evaluate the treatment effect on the expression of genes coding for DNAMET's. Different cryoconservation by vitrification treatments were designed using the plant vitrification solution 2 (PVS2) and liquid nitrogen (LN) by changing the immersion time in PVS2 and LN. Treatments effects on embryo viability were assessed by embryo development or reduction of the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride salt (TTC). A expression library was created to isolate expressed sequence tags (EST's) of genes coding for DNAMET's. EST's regulation of expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase polychain reaction (qRT-PCR). It was recorded a concomitant embryo viability reduction with increases in the immersion time in PVS2 and LN analyzed by TTC. The vitrification optimal conditions were 10 minutes in PVS2 50% concentrated at 25 °C, followed by 10 minutes in PVS2 100% concentrated at 4 °C. Under these conditions, it was possible to induce up to 30% of the embryos treated after LN immersion during 30 minutes. With the designed oligonucleotides, it was possible to amplify and sequence two EST's of the domains-rearranged 5-cytosine DNA methyltransferases family, two EST's of the 5-cytosine DNA methyltransferases type I family (MET1) and one EST of the chromatin organization modifier 5-cytosine methyltransferase (CMT). It was recorded changes in expression of one gene coding for MET1 and gene coding for DRM due to the cryoconservation by vitrification treatment by qRT-PCR. It was concluded that the genes analyzed are part of the epigenetic regulation and it is possible that cryoconservation by vitrification treatments changes the DNA methylation pattern of grape zygotic embryos.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, zygotic embryo, cryoconservation, vitrification, DNA methyltransferase.

## I. INTRODUCCIÓN

La uva (*Vitis vinifera* L.) es considerado un cultivo de importancia económica a nivel mundial, siendo México uno de los principales países productores. El estado de Sonora produce el 75% del total y exporta alrededor del 88% de esta producción (Vázquez-Villanueva, 2011). Lo anterior, hace del cultivo de la uva una de las actividades más importante desde el punto de vista económico para nuestro estado (Maldonado-Navarro et al., 2011). El germoplasma de *V. vinifera* es muy amplio, se estima que existen entre 6,000 y 10,000 cultivares en el mundo (Laucou et al., 2011). A pesar de la gran extensión de cultivo con que cuenta esta especie, en la actualidad, variedades tanto silvestres como domesticadas se consideran en peligro de extinción (Imazio et al., 2007). Debido a esto, organizaciones internacionales han implementado estrategias para su preservación, con el objetivo de mantener el germoplasma de esta especie para futuros programas de mejoramiento genético (Barth et al., 2009).

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en México cuenta con un banco de germoplasma de vid para las variedades cultivadas en el estado de Sonora, ubicado en la costa de Hermosillo; en el cual las plantas se propagan de manera rústica, por estacas ([www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)). En estas condiciones, las plantas son vulnerables a los cambios ambientales. Además, los costos por mantenimiento asociados a las labores agrotécnicas son altos, ya que resulta necesario controlar las plagas y enfermedades y realizar un manejo de campo constante (Panis y Lambardi, 2006). Debido a la importancia económica, nutricional y patrimonial que representan este cultivo para nuestro estado, es importante desarrollar estrategias que permitan mantener su germoplasma conservado de manera segura por un largo periodo de tiempo, para las futuras generaciones.

Existen diversas técnicas de conservación de germoplasma; dentro de las más importantes se encuentran los bancos de semillas y el cultivo *in vitro*. No obstante, estas técnicas solo permiten la conservación de las especies vegetales a corto o mediano plazo. La criopreservación es el único método con el que se cuenta en la actualidad para lograr la conservación *in vitro* por periodos prolongados de tiempo (Engelmann, 1991). Una limitante de la criopreservación es el daño causado al material vegetal, debidos a la formación de cristales de hielo intra- y extracelulares o a la extrema reducción del agua y del volumen celular. Estos daños se pueden prevenir mediante la aplicación de crioprotectores durante el congelamiento, que induzcan la transición física de las soluciones acuosas a un estado vítreo y amorfo no cristalino. A este proceso se le denomina vitrificación y constituye la base principal de las técnicas modernas de criopreservación (Sakai et al., 2000).

La solución para vitrificación de plantas 2 (PVS2) es una de las soluciones utilizadas para la crioprotección que ha dado mejores resultados en la vitrificación de tejidos vegetales (Marković et al., 2013). De tal manera, que la criopreservación utilizando PVS2 es uno de los métodos más utilizado en la actualidad (Panis y Lambardi, 2006). Se ha demostrado su utilidad en la criopreservación de especies en peligro de desaparecer (Sen-Rong y Ming-Hua, 2009) y de importancia agrícola (Panis et al., 2005). En los últimos años, se han realizado diversos estudios con el objetivo de implementar la técnica de criopreservación por vitrificación para la conservación del germoplasma de *V. vinifera*, mediante los cuales se ha logrado mantener células embriogénicas, meristemos apicales y meristemos axilares viables después de ser mantenidos en nitrógeno líquido (Matsumoto y Sakai, 2003; Wang et al., 2004; Hassan y Haggag, 2013; Marković et al., 2013; Lazo-Javalera et al., 2014).

A pesar de que la vitrificación permite mantener la viabilidad de los tejidos después de ser conservados en nitrógeno líquido, diversos estudios han mostrado cierto nivel de toxicidad por la adición de crioprotectores a tejidos vegetales (Finkle y Ulrich, 1979). Además, la aplicación de estas técnicas implica la exposición del tejido vegetal a estrés abiótico, lo cual pueden inducir alteraciones a nivel molecular que generen cambios en



la expresión de genes (Harding, 2004). Estas alteraciones son consideradas un problema importante, ya que pueden originar variación somaclonal, induciendo alteraciones fenotípicas en las plantas regeneradas a partir del material vegetal, con lo cual no se logra el objetivo principal de la crioconservación (Miguel y Marum, 2011).

Las modificaciones genéticas inducidas por la crioconservación y manipulación *in vitro* de plantas pueden ser a nivel cromosómico o en la secuencia de bases del ADN (Phillips et al., 1994; Winarto et al., 2010). Evidencias experimentales indican que el tejido vegetal crioconservado puede estar exento de estos cambios (Zhai et al., 2003); sin embargo, es conocido que a pesar de no encontrarse variación en la secuencia del ADN en un organismo en estudio, existen otros mecanismos moleculares que pueden alterar los patrones de expresión de genes. Estas alteraciones pueden a su vez causar cambios fenotípicos en las plantas; a este tipo de regulación molecular se le conoce como epigenética (Rapp y Wendel, 2005). Actualmente se conocen tres mecanismos epigenéticos que regulan la codificación de la información en el genoma, estos son: remodelación de la cromatina y modificación de histonas, la actividad de ácidos ribonucleicos (ARN's) no codificantes y la metilación de citosinas en la cadena de ADN (Achrem et al., 2012).

La metilación de citosinas es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en plantas (Saze et al., 2012). Esta modificación participa en la replicación y diferenciación celular, silenciamiento de elementos de transposición y expresión de genes en respuesta a estímulos externos (Vanyushin, 2005). Diversos estudios demuestran la inducción de estas modificaciones por efecto de la crioconservación y vitrificación en tejido vegetal (Kaity et al., 2009; Wang y He, 2009). Las variaciones en el patrón de metilación del ADN parecen presentarse con mayor frecuencia que las modificaciones en la secuencia de ADN en respuesta a la crioconservación (Channuntapipat et al., 2003). Estas variaciones pueden dar origen a alteraciones funcionales de fenómenos muy complejos; por lo tanto, su mantenimiento se considera indispensable para el desarrollo normal de las plantas (Zhang et al., 2010).

La metilación de ADN se realiza por la actividad enzimática de las 5-citosina ADN metiltransferasas (ADNMET's). En plantas, estas enzimas se clasifican dentro de tres familias: 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1 (MET1), 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados (DRM) y 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina (CMT) (Dai et al., 2005). Actualmente se sabe que están involucradas en procesos de división y diferenciación celular. Existen varios estudios en los que se han observado cambios en la expresión de genes codificando estas enzimas y la importancia de su participación durante el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Bernacchia et al., 1998; Giannino et al., 2003; Teerawanichpan et al., 2004; Dai et al., 2005; Solís et al., 2012)). Evidencias experimentales demuestran que la exposición de tejidos vegetales a distintos tipos de estrés genera cambios en la expresión de genes codificando ADNMET's y una consecuente desmetilación del ADN (Steward et al., 2000).

Mediante microarreglos ha sido posible observar que el tratamiento con crioprotectantes y la exposición a nitrógeno líquido generan cambios en la expresión de genes en meristemos apicales de *Arabidopsis* (Volk, 2010). Asimismo, en células reproductivas de mamíferos se ha observado que la vitrificación y crioconservación causa una disminución en la expresión de genes codificando ADNMET's (Zhao et al., 2013; Zeng et al., 2014). Sin embargo, aún no se cuenta con estudios que hayan evaluado los cambios en la expresión de genes que codifican para ADNMET's producidos por efecto de la crioconservación por vitrificación en plantas, lo cual es importante para apoyar en la elucidación de los cambios epigenéticos en organismos vegetal en respuesta a factores extrínsecos.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar los cambios en la expresión de transcritos codificando ADNMET's en *V. vinifera* por efecto de la crioconservación por vitrificación, utilizando como material biológico de estudio embriones cigóticos de la variedad 'Red Globe', cultivada en el estado de Sonora. Asimismo, se evaluó el efecto de la aplicación de las técnicas mencionadas en la viabilidad y capacidad de

regeneración de los embriones. Se espera que los resultados obtenidos ayuden en la elucidación de los mecanismos de respuesta epigenética a estreses abióticos en plantas.

## II. ANTECEDENTES

### II. I. El Cultivo de Vid en Sonora

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia *Vitaceae*. Esta especie es muy diversa; se cree que existen más de 6,000 cultivares en el mundo (Laucou et al., 2011). Su cultivo es considerado de importancia económica a nivel mundial, debido en parte a la variedad de usos que se le pueden dar a su fruto, además del aporte nutricional y los beneficios a la salud como consecuencia de su consumo. Algunos de los efectos benéficos a la salud por el consumo de uva son la prevención de enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y neurodegenerativas (Basli et al., 2012; Huang et al., 2012; Tomé-Carneiro et al., 2012).

México se encuentra entre los principales productores de uva a nivel mundial; siendo el estado de Sonora el mayor productor y exportador de uva de mesa en nuestro país, produciendo alrededor del 75% del total. Esta producción representa el 88% del total de las exportaciones de la fruta de la uva (Vázquez-Villanueva, 2011), haciendo de la viticultura una de las actividades más importante desde el punto de vista económico para nuestro estado (Maldonado-Navarro et al., 2011). Las variedades más ampliamente plantadas son 'Flame Seedless' 'Perlette', 'Superior' y 'Red Globe' en ese orden (Vázquez-Villanueva, 2011). Debido a la importancia económica y nutricional que representa este producto para nuestro país y para el mundo, es importante desarrollar estrategias para mantener el germoplasma de esta especie vegetal conservado por un largo periodo de tiempo. Esto con el objetivo de preservar para las futuras generaciones este recurso biológico de tanta importancia.

## II. II. Conservación de Germoplasma

Se conoce como germoplasma a la diversidad genética de especies vegetales silvestres disponibles en la biósfera para la humanidad. El término germoplasma vegetal, implica las distintas estructuras vegetales (semillas, esporas, tejidos o células) con la información genética suficiente para regenerar una planta completa (Bacchetta et al., 2008) y con la capacidad para transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra (Witt, 1985). En la actualidad, el germoplasma es conservado en bancos de germoplasma, los cuales constituyen un gran apoyo para los programas de mejoramiento de los cultivos y en el desarrollo sostenible de la agricultura (Rao et al., 2007).

La conservación de la biodiversidad de especies de plantas es esencial para poder diseñar programas de mejoramiento vegetal tradicional o con la asistencia de herramientas derivadas de la tecnología del ADN recombinante. Además, esta biodiversidad provee compuestos naturales de importancia farmacéutica y alimentaria (Panis y Lambardi, 2006). Por lo anterior, el germoplasma es considerado un recurso vital e irremplazable, que se debe conservar para mantener y ampliar las opciones para la producción agrícola en un futuro, en un mundo que afronta las consecuencias del cambio climático y otros desafíos; como la contaminación de grandes áreas que no pueden ser utilizadas para la agricultura (Rao et al., 2007). Los bancos de germoplasma se apoyan en diversas técnicas de conservación, las cuales se describen a continuación.

### II. II. I. Conservación *in situ*

A la conservación de germoplasma a través del manejo en su hábitat natural se le conoce como conservación *in situ*, y se define como el conjunto de estrategias adoptadas para favorecer la recuperación o la salvaguarda de la diversidad genética y de los organismos en la naturaleza (Bacchetta et al., 2008). Sin embargo, esta estrategia de conservación es riesgosa ya que se puede perder germoplasma valioso (pérdida de diversidad genética)

debido a plagas, enfermedades o condiciones ambientales adversas (Panis y Lambardi, 2006). Además, requiere de grandes extensiones de tierra y un monitoreo cuidadoso periódico, lo que se traduce en un alto costo de operación. Como ejemplo, se puede considerar lo costoso que resulta la preservación de germoplasma de *Prunus* spp., un árbol frutal propagado vegetativamente el cual requiere el mantenimiento de alrededor de 30,000 accesiones en el campo (Gass et al., 1996). Una alternativa prometedora a la conservación *in situ* son los métodos de conservación *ex situ*.

## **II. II. II. Conservación *ex situ***

Después de la “Revolución verde” (1970), surgieron variedades con mejores características y genéticamente uniformes de las principales plantas utilizadas para la producción alimenticia; consecuentemente, esto condujo a una reducción en la diversidad genética de los cultivos. En respuesta, el Centro Internacional de Investigación Agrícola (IARC, por sus siglas en inglés), inició un programa para la conservación de especies tanto silvestres como de cultivo para mantener la diversidad genética de plantas. Debido a esta demanda, resultó necesario el surgimiento de estrategias de conservación menos costosas, que requirieran menos espacio y que permitieran el almacenamiento por periodos prolongados de tiempo (Engelmann y Engels, 2002).

Este interés de la comunidad internacional trajo como consecuencia el desarrollo de las técnicas de conservación *ex situ*. Esta se define como la conservación de la diversidad genética y de los organismos fuera de los ámbitos naturales en los que se encuentran (Bacchetta et al., 2008). Como resultado, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) en 1996 ya se contaba con 1,300 bancos de germoplasma incluyendo alrededor de 6 millones de accesiones. Las estrategias de conservación *ex situ* se dividen en técnicas específicas como son: conservación en suelo (invernaderos), bancos de semillas, almacenamiento *in vitro* y crioconservación, principalmente. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y

limitaciones (Engelmann y Engels, 2002). Actualmente, la mayoría de los esfuerzos de conservación se concentran en el desarrollo de las últimas tres técnicas.

II. II. II. I. Bancos de semillas.- Muchos de los principales cultivos de plantas producen semillas que pueden resistir a la deshidratación y ataque de patógenos; a este tipo de semillas se les llama ortodoxas y constituyen el principal método de conservación *ex situ* de germoplasma (Bacchetta et al., 2008). A través de los años se han desarrollado estrategias que permiten mantener a las semillas viables por décadas. Esta técnica consiste en disminuir el contenido de humedad de las semillas y almacenarlas en contenedores herméticamente sellados a temperaturas bajas (alrededor de los  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Durante el almacenamiento, es necesario monitorear periódicamente la viabilidad de las accesiones y estandarizar protocolos para detener la dormancia e inducir la germinación de las semillas (Engelmann y Engels, 2002).

En contraste con las semillas ortodoxas, algunas plantas producen semillas que no resisten a la desecación. A este tipo de semillas se les conoce como recalcitrantes y son producidas por más del 70% de las especies de ecosistemas tropicales y subtropicales (Bacchetta et al., 2008). Aunado a esto, especies de importancia agrícola como *Solanum tuberosum*, *Dioscorea* spp., *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* y *Sacharum* spp. producen semillas estériles. Además, existen especies que no producen semillas y se propagan vegetativamente; como es el caso del plátano (*Musa* spp.) y algunas variedades de *V. vinifera* (‘Flame Seedless’, ‘Superior’ y ‘Perlette’); principales variedades cultivadas en el estado de Sonora. Algunos autores señalan que la variedad de uva ‘Red Globe’ produce semillas recalcitrantes, por lo que la conservación en bancos de semillas para esta variedad resulta ineficiente (Wang et al., 2004). Por otra parte, evidencias experimentales generadas en nuestro laboratorio (García-Coronado et al., 2015: información no publicada) permiten concluir que gran parte de las semillas de uva de esta variedad cultivada en el estado de Sonora, produce semillas que no completaron su desarrollo y no poseen endospermo y/o embrión.

El deterioro fisiológico es otra de las dificultades de la conservación de germoplasma en bancos de semillas. A pesar de que estas pueden ser conservadas viables por periodos de tiempo considerablemente largos, el porcentaje de viabilidad disminuye al aumentar el tiempo de conservación, causando la pérdida de variabilidad genética. De la misma manera, existe el riesgo del alojamiento de patógenos no detectables visualmente en algunas semillas, lo que puede agravar el deterioro fisiológico durante el almacenamiento o comprometer la viabilidad de la planta al momento de su regeneración (Kantha, 1985). Por la problemática mencionada, una de las alternativas a los bancos de semillas para la conservación de especies es el cultivo *in vitro*.

II. II. II. II. Cultivo *in vitro*.- Durante los últimos años, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se ha desarrollado extensivamente; y en 1991 ya se había aplicado en más de 1,000 especies de plantas. Esto se debe a que mediante esta técnica es posible obtener un número muy alto de individuos a partir de un mismo individuo y de mantener el germoplasma en condiciones asépticas. Una de las principales desventajas del cultivo *in vitro* para la conservación de germoplasma es la necesidad de realizar subcultivos periódicos del material vegetal. Existen diversas estrategias para aumentar el intervalo entre dichos subcultivos; estas consisten en la reducción de los nutrientes del medio de cultivo y de la temperatura con el fin de retardar el desarrollo de la plántula. Sin embargo, estas estrategias solo logran la conservación del germoplasma a corto o mediano plazo. El único método con el que se cuenta en la actualidad para lograr la conservación *in vitro* por periodos prolongados de tiempo es la crioconservación (Engelmann, 1991).

II. II. II. III. Crioconservación.- La crioconservación es el método más efectivo para la preservación de germoplasma disponible en la actualidad (Engelmann, 2011). Esta se define como la preservación de células viables, tejidos u órganos a temperaturas ultra-bajas, principalmente mediante la utilización de nitrógeno líquido que posee una temperatura de ebullición de  $-196^{\circ}\text{C}$  (Marco-Medina y Serrano-Martínez, 2012). A esta



temperatura, la actividad metabólica de la célula así como fenómenos químicos y físicos se reducen a un mínimo con lo que el material vegetal puede ser almacenado por períodos ilimitados. Se ha demostrado que es extremadamente útil para el almacenamiento seguro de tejidos de plantas con características importantes desde el punto de vista médico, biológico o farmacéutico (Panis y Lambardi, 2006). Es importante mencionar, que no se espera que esta técnica reemplace a los métodos de conservación de germoplasma tradicionales, sino que sea un auxiliar para prevenir la pérdida de especies vegetales.

En la última década, las tecnologías en crioconservación de plantas han avanzado rápidamente y en la actualidad se cuenta con protocolos de crioconservación establecidos para un gran número de tejidos y órganos vegetales. Se ha comprobado que la crioconservación de células en suspensión, callos y meristemas cultivados *in vitro*, permite el desarrollo y establecimiento de plantas completas después de ser descongeladas (Panis y Lambardi, 2006). Existen reportes que sugieren que la totipotencia de los tejidos no diferenciados, no se afecta por el almacenamiento en nitrógeno líquido. Asimismo, se ha observado que la crioconservación de plátano, uva, café, arroz y maíz provee un recurso constante de células para la producción de plantas completas (Cornejo et al., 1995).

Dentro de las técnicas clásicas de crioconservación, se encuentra el método de secado con flujo de aire o sílica gel y el enfriamiento en dos pasos o congelamiento lento. Éste último consiste en una disminución gradual de la temperatura (de 0.1 a 4°C por minuto) hasta alcanzar los -40°C para posteriormente sumergir en nitrógeno líquido. Una limitante de éstas técnicas son los posibles daños causados al material vegetal debido principalmente a la formación de cristales de hielo intra- y extracelulares o a la extrema reducción del agua y del volumen celular (Sakai et al., 2000).

Cuando se desea congelar y descongelar utilizando temperaturas ultra-bajas un sistema biológico sin ocasionar daños, es importante considerar la velocidad del congelamiento y la concentración de solutos. Durante un congelamiento lento los cristales de hielo

extracelulares son los primeros en formarse, ocasionando un aumento en la concentración de sales extracelulares. Esto provoca la salida de agua del interior de la célula, reduciendo su volumen y deshidratándola (Kantha, 1985). Cuando el congelamiento es demasiado rápido, el agua intracelular permanece en el interior de la célula, formando grandes cristales que rompen las membranas intracelulares. Para prevenir daños al crioconservar un sistema biológico, el procedimiento debe evitar la formación de grandes cristales de hielo sin una reducción extrema del agua intracelular lo cual puede realizarse mediante la vitrificación (Sakai et al., 2000). Por lo anterior, las técnicas modernas de crioconservación se basan en esta técnica.

### II. III. Crioconservación por Vitrificación

La vitrificación es la transición física de una solución acuosa a un estado vítreo y amorfo no cristalino (Sakai et al., 2000). Cuando un sistema biológico se encuentra a 0°C se comienzan a formar agregados de agua sólida en forma de pequeños cristales; a este fenómeno se le conoce como nucleación homogénea de agua (unión agua-agua). Al disminuir la temperatura por debajo de los 0°C, estos eventos aumentan y los cristales de hielo crecen. En estas mismas condiciones, cuando la concentración de solutos es muy alta, se presentan mayormente eventos de unión de agua con solutos (nucleación heterogénea), disminuyendo la formación y/o el crecimiento de los cristales de hielo. La crioconservación por vitrificación consiste en la aplicación de solutos al material vegetal antes de ser congelado. Estos solutos, denominados crioprotectores, al encontrarse disueltos en el sistema biológico reducen los eventos de nucleación homogénea y aumentan la nucleación heterogénea, disminuyendo así la formación de cristales de hielo dentro y fuera de la célula. Además, disminuyen el punto de fusión y aumentan la viscosidad del medio evitando la pérdida excesiva de agua durante la crioconservación (Kantha, 1985).

Existe una gran variedad de compuestos con propiedades para funcionar como crioprotectores. Sin embargo, los que han mostrado mejores resultados son el

dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, la sacarosa y los etilenglicoles. El glicerol es un crioprotector penetrante que actúa a nivel intra- y extracelular, no es tóxico a altas concentraciones y su energía de superficie es muy similar a la del agua. Esta característica le permite mantener la estructura de las macromoléculas y la estabilidad de las membranas intracelulares. No obstante, su paso a través de la membrana y la pared de células vegetales es mucho más lento que el del agua lo que puede causar un daño osmótico durante su introducción y remoción. El DMSO posee una rápida penetración celular y actúa reduciendo la permeabilidad del agua a través de la membrana; sin embargo, se ha observado que es tóxico en altas concentraciones (Kantha, 1985). Estudios demuestran que el uso de soluciones que combinan uno o más crioprotectores tiene un mejor efecto en la protección del tejido vegetal, especialmente la combinación de “no penetrantes” con aquellos que sí lo son (Marković et al., 2013).

La concentración excesiva de crioprotectores no penetrantes en el exterior podría causar una deshidratación celular; este equilibrio se puede mantener al utilizar crioprotectores penetrantes que aumente la concentración de solutos en el interior. La sacarosa, un crioprotector no penetrante y no tóxico, reduce la concentración de iones y aumenta la viscosidad extracelular, evitando la salida excesiva de agua (Farrant y Woolgar, 1972). La combinación de glucosa, DMSO y glicerol parece tener un mejor efecto en la protección del material vegetal en contraste con su utilización individual. El polietilenglicol (PEG), otro crioprotector no penetrante, ha demostrado no poseer propiedad crioprotectora usado en forma independiente (al 25%). Sin embargo, su uso en conjunto con DMSO y glucosa, aumenta su actividad crioprotectora (Ulrich et al., 1979). En la actualidad, la solución para vitrificación de plantas 2 (PVS2) es la solución que ha dado mejores resultados en la vitrificación de tejidos. Esta solución, emplea la acción combinada de los crioprotectores glicerol (30%), DMSO (15%), sacarosa (0.15 M) y etilenglicol al 15% (Marković et al., 2013).

La crioconservación utilizando soluciones de vitrificación es uno de los métodos de conservación de germoplasma más utilizado en la actualidad. Es fácil de realizar, de alta reproducibilidad y puede ser aplicado en una amplia variedad de tejidos y especies de

plantas. Estas características la hacen una técnica promisoría para la preservación de especies vegetales, principalmente aquellas en peligro de extinción (Panis y Lambardi, 2006). Un ejemplo de ello, es la conservación del germoplasma de *Emmenopterys henryi* Oliv., un árbol endémico de China, usado para la elaboración de madera y algodón. Este árbol se encuentra en peligro de extinción; para su conservación se desarrolló un protocolo de crioconservación por vitrificación. Mediante el desarrollo de esta técnica, que involucra el tratamiento con la solución de vitrificación PVS2, se logró crioconservar meristemos apicales de *E. henryi* Oliv., de los cuales el 75-85% mostraron capacidad para desarrollarse (Sen-Rong y Ming-Hua, 2009).

En el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima, Perú, se conservan 345 accesiones usando el protocolo de vitrificación. En Leuven, Bélgica, se encuentran almacenadas 306 accesiones de plátano conservadas también por el método de vitrificación (Panis et al., 2005). Además, se han realizado esfuerzos similares para la crioconservación de tapioca, ajo, menta y especies australianas en peligro de extinción. Aun cuando se han desarrollado protocolos de crioconservación para un gran número de especies de plantas, la utilización de esta técnica para la conservación de la biodiversidad de plantas aún es limitada (Panis y Lambardi, 2006); esto se debe en parte a que cada cultivar requiere de un protocolo adaptado a las características de sus tejidos y su fisiología.

## II. IV. Conservación de Germoplasma de Vid

### II. IV. I. Bancos de Germoplasma de Vid a Nivel Mundial y Nacional

El germoplasma de *V. vinifera* es muy amplio y como se mencionó anteriormente existen entre 6,000 y 10,000 cultivares en el mundo (Laucou et al., 2011). Estos cultivares se encuentran registrados en el catálogo internacional de variedades de vid (VIVC) y en el catálogo europeo de uva (Lacombe et al., 2011). A pesar de la gran extensión de cultivo a nivel mundial con que cuenta esta especie, en la actualidad,

variedades tanto silvestres como domesticadas se consideran en peligro de extinción. Un ejemplo de esto es la variedad silvestre *V. vinifera* ssp. *sylvestris*, cuya conservación se considera esencial para el mantenimiento de la diversidad genética de vid. Hace más de dos décadas, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), la registró en la lista europea de plantas en peligro de extinción (Imazio et al., 2007). Debido a esto, las organizaciones internacionales empezaron a desarrollar estrategias para su preservación *ex situ*, con el objetivo de contar con el germoplasma de esta especie para futuros programas de mejoramiento genético (Barth et al., 2009).

En los últimos quince años, con el objetivo de prevenir la extinción de variedades de vid, el grupo de viticultura del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), que opera en España, se ha dedicado a la preservación de estas especies en bancos de germoplasma (Santana et al., 2008). Con el mismo objetivo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Instituto Nacional de Investigación Agrícola de Francia (INRA) también cuentan con bancos de germoplasma para las variedades de vid cultivadas en estos países (Dangl et al., 2001; [www1.montpellier.inra.fr/vassal/](http://www1.montpellier.inra.fr/vassal/)). En la actualidad, los esfuerzos para contribuir en la conservación de germoplasma de vid han aumentado. Bases de datos internacionales, de la Unión Europea y Estados Unidos contienen información sobre el recurso genético de uva disponible y las colecciones de germoplasma existentes. La mayoría de los principales países viticultores cuentan con colecciones de germoplasma de uva. Se estima que a nivel mundial existen alrededor de 130 depósitos, de los cuales los más grandes incluyen más de 7,000 accesiones ([www.vitaceae.org](http://www.vitaceae.org)).

En México, en bancos de germoplasma de la Universidad Autónoma del Estado de México (Toluca), la Universidad Autónoma de Chapingo (Veracruz) y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se encuentran almacenadas accesiones silvestres del género *Vitis* spp. Entre los principales usos que se le dan a sus frutos se encuentran el consumo de bayas frescas, en mermeladas y en infusiones de hojas para malestares cardíacos. Además, existe la posibilidad de utilizar estas vides silvestres como portainjertos para la producción de uva de interés comercial (Mora et al., 2008).

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) cuenta con un banco nacional de germoplasma de vid, ubicado en la región de La Laguna, en Coahuila. En este centro se conservan más de 250 variedades de vid por técnicas *ex situ* ([www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)). Asimismo, en la región de la costa de Hermosillo hay un banco de germoplasma *in situ* para las variedades cultivadas en Sonora, en el cual las plantas se propagan de manera rústica, por estacas. En estas condiciones, las plantas son vulnerables a los cambios ambientales. Además, los costos por mantenimiento asociados a las labores agrotécnicas son altos, ya que resulta necesario controlar las plagas y enfermedades y realizar un manejo de campo constante. Por todo lo anteriormente expuesto, se considera importante el desarrollo y mejoramiento de nuevas estrategias para la conservación segura y por un largo periodo de tiempo del germoplasma de las variedades de vid importantes para nuestro estado.

#### **II. IV. II. Crioconservación por Vitricación en *Vitis vinifera***

En los últimos años, se han realizado diversos estudios con el objetivo de implementar la técnica de crioconservación por vitricación para la conservación del germoplasma de *V. vinifera*. Wang y colaboradores (2004) lograron obtener células embriogénicas en suspensión viables después de ser sumergidas 1 hora en nitrógeno líquido, gracias a la aplicación de la solución de vitricación PVS2. Este experimento consistió en la realización del procedimiento de encapsulación-vitricación, que consiste en cubrir a las células con un polímero de alginato de calcio y vitricarlas para protegerlas de la exposición al nitrógeno líquido. Dicho tratamiento mostró un porcentaje de 42-76% de células viables post-descongelación. Años más tarde, Lazo-Javalera y colaboradores (2014) vitricaron con la misma solución meristemas axilares de la variedad de uva “Flame Seedless” cultivada en el estado de Sonora, obteniendo un 90% de viabilidad después de ser crioconservadas durante 1 hora en nitrógeno líquido.

Recientemente, los grupos de trabajo de Matsumoto y Sakai (2003), Marković y colaboradores (2013) y Hassan y Haggag (2013) lograron crioconservar meristemas

apicales de *V. vinifera* vitrificándolos con PVS2; dichos experimentos encontraron un 80%, 50% y 46.6% de viabilidad, respectivamente. A pesar de que la vitrificación permite mantener viables los tejidos vegetales después de ser mantenidos en nitrógeno líquido, diversos estudios han mostrado cierto nivel de toxicidad por la adición de crioprotectores a los tejidos. Estos efectos pueden ocurrir debido a la adición y remoción de estos compuestos, sin y con congelamiento (Finkle y Ulrich, 1979). Los daños ocasionados se pueden deber a un efecto osmótico, el efecto de solvente o el efecto de un compuesto químico específico ya que existen evidencias experimentales indicando que algunas soluciones crioprotectoras pueden generar cambios moleculares importantes en plantas (Hervas y Gimenez-Martin, 1973).

Recientemente, se han realizado estudios del efecto de los crioprotectores sobre la actividad de algunas enzimas. Se ha reportado que la introducción, manipulación y reproducción de plantas *in vitro* y la crioconservación por vitrificación causan cambios a nivel genético en el material vegetal. Estos cambios son considerados un problema importante, ya que pueden originar variación somaclonal, induciendo alteraciones fenotípicas en las plantas regeneradas a partir del material vegetal, con lo cual no se logra el objetivo principal de la crioconservación (Miguel y Marum, 2011). Esto representa un reto para la salvaguarda de germoplasma y sugiere la importancia de evaluar los cambios genéticos producidos por la crioconservación por vitrificación en el germoplasma que se desea preservar.

## II. V. Modificaciones Moleculares Producidas por la Crioconservación y la Manipulación *in vitro* de Plantas

La crioconservación por vitrificación implica la exposición del tejido vegetal a estrés abiótico. El conjunto de manipulaciones necesarias para la crioprotección y regeneración del material vegetal a partir de los tejidos crioconservados pueden inducir alteraciones a nivel molecular (Harding, 2004). Debido a lo anterior, resulta necesario evaluar la integridad genética de las plantas crioconservadas, con el objetivo de evitar

variación somaclonal y asegurar que una vez regeneradas, serán fenotípicamente iguales a las plantas de las que provienen.

## **II. V. I. Modificaciones Genéticas**

El funcionamiento normal de un sistema biológico es resultado de la activación o inhibición de la expresión de genes específicos, lo cual es controlado por las regiones reguladoras de cada gen. Se ha observado que estreses bióticos y abióticos causan cambios en la expresión de genes (Pardue, 1991). En cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es posible aislar un tejido de una planta para obtener tejido no diferenciado. Este tejido es posteriormente inducido a la diferenciación para obtener, en la mayoría de los casos, plantas completas. Al “de-diferenciar” y diferenciar nuevamente un tejido el genoma muestra alteraciones en la regulación genética. Por tal motivo, es posible que en condiciones artificiales (*in vitro*) esta reestructuración y “re-diferenciación” no presente el mismo orden que seguiría en condiciones naturales, al menos en lo que respecta a los mecanismos genéticos. Esto puede inducir una alteración en la programación normal de la información genética y consecuentemente inducir alteraciones fenotípicas en los nuevos organismos formados (Phillips et al., 1994).

Las alteraciones genéticas (y consecuentemente fenotípicas) en el material vegetal se deben principalmente a una respuesta al estrés (Phillips et al., 1994). Las modificaciones genéticas observadas en plantas pueden ser a nivel cromosómico o en la secuencia de bases del ADN. Considerando las modificaciones cromosómicas, se encuentran las poliploidias, aneuploidias y disploidias. En las poliploidias puede ocurrir la duplicación de todo el genoma produciendo diploidias, triploidias, tetraploidias, octaploidias o mixoploidias. Las aneuploidias se refieren a la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas ocurriendo monosomías, disomías, trisomías, etc. Mientras que las disploidias involucran la traslocación, deleción, duplicación e inversión de fragmentos de uno o más cromosomas (De Storme y Mason, 2014).



La inducción *in vitro* de tejido no diferenciado a partir de embriones de *Cucumis sativus* L. es un ejemplo claro de inducción de estos cambios genéticos. En este estudio se evaluó la estabilidad genética mediante citometría de flujo encontrando distintos niveles de ploidías (diploidías, triploidías, tetraploidías y mixoploidías) causadas por el cultivo *in vitro*. Asimismo, se observó que el número de ploidías aumentaba con la edad de los cultivos y que la poliploidización estaba relacionada con una disminución gradual del poder de regeneración del tejido (Kubaláková et al., 1996). En un estudio más reciente, Winarto y colaboradores (2010) observaron variaciones morfológicas en plántulas obtenidas a partir de cultivo de anteras de *Anthurium andreanum*. En base a esto decidieron evaluar su estabilidad genética, encontrando que las plántulas regeneradas eran haploides, diploides y triploides.

Existen modificaciones del genoma que pueden no involucrar cambios en el número o estructura de los cromosomas. Estas modificaciones alteran la secuencia de ADN y también han sido observadas frecuentemente en respuesta a la crioconservación y la manipulación *in vitro* de plantas (Phillips et al., 1994). Dentro de los eventos que pueden modificar la secuencia de ADN del material vegetal se encuentran: la variabilidad en el número de secuencias repetidas en tándem (Landsmann y Uhrig, 1985; Sutherland y Richards, 1994) la movilización de elementos de transposición (Peschke y Phillips, 1991) y la sustitución, eliminación o inserción de una base nitrogenada; produciendo polimorfismos o mutaciones en un gen específico. El desarrollo de estas alteraciones puede ocasionar diferencias fenotípicas respecto a la planta original (Phillips et al., 1994). Existen estudios que han demostrado la presencia de estos cambios por efecto de la crioconservación por vitrificación en plantas.

Sánchez y colaboradores (2008) evaluaron el poder de regeneración y la estabilidad genética mediante amplificación aleatoria de fragmentos de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) de seis líneas embriogénicas de *Quercus robur* que fueron vitrificadas y crioconservadas durante una semana y un año. La vitrificación consistió en el tratamiento con PVS2 por 0, 60, 90 y 120 min. a 0°C y 24°C. Los porcentajes de regeneración variaron del 57 al 92% sin encontrar diferencias en el patrón de amplicones

entre el tratamiento de una semana y un año en criopreservación. Además, no se observaron anomalías fenotípicas por efecto de los tratamientos. Sin embargo, una de las líneas embriónicas criopreservadas por un año mostró 7 bandas polimórficas, lo que indica una frecuencia de variación del 0.06 al 2.8%. Los autores señalan que esta variación es muy baja y que se debe considerar como un hallazgo marginal que se presenta como consecuencia de la criopreservación por periodos prolongados y no por el cultivo *in vitro* o la vitrificación.

Kaity y colaboradores (2008) evaluaron la estabilidad genética mediante RAPD y la tasa de recuperación de meristemas vegetativos provenientes de 12 genotipos de papaya después de ser criopreservadas por la técnica de vitrificación. Dichos autores reportan porcentajes de recuperación del 61 al 73% y sostienen que las plántulas regeneradas mostraron niveles variables en cuanto a las modificaciones en la secuencia del ADN genómico (0-10.07%). De igual forma, Antony y colaboradores (2012) evaluaron la regeneración y estabilidad genética por RAPD de embriones en estado de desarrollo de protocormos de *Dendrobium Bobby Messina* que fueron criopreservados por vitrificación. En este experimento se observó un 40% de regeneración después de la criopreservación y un 5.5% y 10% de polimorfismos de los protocormos por efecto de la vitrificación y la criopreservación, respectivamente.

En contraste con lo anterior, Harding (2004) en un artículo de revisión, reporta diversos análisis de integridad genética en los que se encontró que el ADN de diversas especies permanece sin modificaciones polimórficas o poliploides después de ser criopreservadas. También se incluyen estudios en los que no se encontraron diferencias morfológicas en plantas originadas a partir de material criopreservado. De acuerdo con esto, en un estudio reciente realizado por Wang y colaboradores (2014a), se analizó la presencia de modificaciones polimórficas o poliploides en meristemas apicales de *Chrysanthemum morifolium* que fueron criopreservados por vitrificación. Los polimorfismos y poliploidias se evaluaron mediante secuencias repetidas simples (SSR, por sus siglas en inglés) y citometría de flujo, respectivamente. Estas técnicas se aplicaron a las variedades que resultaron con el mayor (83%) y menor (43%) porcentaje

de regeneración después de la crioconservación. Como resultado, no se observaron bandas polimórficas por efecto de la crioconservación y los niveles de ploidía se mantuvieron en los dos genotipos analizados a pesar de sus diferencias en la capacidad de regeneración.

En un estudio similar, Wang y colaboradores (2014b) analizaron la integridad genética de meristemas de *Solanum tuberosum* regenerados después de ser crioconservados por vitrificación. La vitrificación consistió en el tratamiento a 0°C con PVS2 al 60% por 30 min., PVS2 al 80% por 30 min. y finalmente PVS2 al 100% por 40 min.; con una posterior crioconservación durante 1 hora en nitrógeno líquido. Como resultado, no se observaron nuevas bandas polimórficas por efecto de la vitrificación y/o crioconservación mediante las técnicas de regiones de ADN localizadas entre las secuencias simples repetidas (ISSR) y fragmentos amplificados mostrando polimorfismo de tamaño (AFLP). Experimentos realizados en *V. vinifera* mediante RAPD también reportan no haber encontrado variaciones en la secuencia de ADN de plántulas regeneradas a partir de meristemas crioconservados durante 24 horas en nitrógeno líquido (Zhai et al., 2003); es importante mencionar que el protocolo de crioconservación usado fue el método de encapsulación-dsecación, que no involucra la exposición a PVS2.

En un trabajo realizado por Lazo-Javalera y colaboradores (2014) se detectó mediante la técnica de RAPD la inducción de polimorfismos por efecto de la crioconservación y descongelación pero no por efecto del tratamiento con PVS2 en yemas axilares de *V. vinifera*. Estas evidencias experimentales demuestran que plantas cultivadas *in vitro* y crioconservadas por vitrificación pueden no experimentar modificaciones en la secuencia de ADN, eliminaciones o inserciones inespecíficas por efecto del tratamiento. Sin embargo, es conocido que a pesar de no encontrarse variación en la secuencia del ADN en un organismo en estudio, existen otros mecanismos moleculares que pueden alterar los patrones de expresión de genes. Estas alteraciones pueden a su vez causar cambios fenotípicos en las plantas; a este tipo de regulación genética se le conoce como epigenética (Rapp y Wendel, 2005).

## II. V. II. Alteraciones Epigenéticas

Actualmente se conocen tres mecanismos epigenéticos que regulan la codificación de la información en el genoma, estos son: remodelación de la cromatina y modificación de histonas, la actividad de ácidos ribonucleicos (ARN's) no codificantes y la metilación de citosinas en la cadena de ADN. Estos mecanismos interactúan entre sí para definir en parte el “código epigenético”, regulando la expresión de genes en un organismo en respuesta a factores bióticos o abióticos (Achrem et al., 2012).

La remodelación de la cromatina involucra la sustitución de histonas del nucleosoma por otras histonas con propiedades distintas (Iwatani et al., 2006) o la modificación enzimática de estas. Esta modificación ocurre en los residuos de lisina de las histonas y puede ser por metilación, acetilación y fosforilación (Almanza et al., 2010). La metilación de histonas genera una unión más estrecha entre el nucleosoma y el ADN, mientras que la acetilación y fosforilación inducen la separación (Grant-Downton y Dickinson, 2005). Cuando las histonas del nucleosoma se encuentran estrechamente unidas al ADN se bloquea espacialmente la unión de factores de transcripción a los promotores, evitando la transcripción de genes (Horn y Peterson, 2002). En contraste, la separación del ADN del nucleosoma, hace posible la interacción de proteínas, como factores de transcripción, con los elementos de respuesta de las regiones reguladoras de los genes y consecuentemente ocurre la expresión génica (Owen-Hughes, 2003).

La remodelación de la cromatina es un mecanismo muy dinámico que está influenciado por factores ambientales y sus cambios se reflejan en alteraciones fenotípicas en plantas (Grant-Downton y Dickinson, 2005). Se ha demostrado que cambios inducidos en tabaco, mediante la expresión de genes de la Histona *H1* en antisentido, producen una estructura de la cromatina menos condensada, resultando en una reducción del tamaño de la planta, desarrollo anormal de flores y reducción en la fertilidad del polen (Prymakowska-Bosak et al., 1999). Algunos estudios han demostrado una relación entre la modificación de histonas y la metilación del ADN (Saze et al., 2012); experimentos

en plantas sugieren que la desacetilación de histonas está regulado en parte por la metilación del ADN (Zemach y Grafi, 2003).

El mecanismo epigenético por el cual ARN's no codificantes regulan la expresión de genes es mediante su actividad catalítica e induciendo la metilación del ADN. En el primer caso, micro ARN's se unen a diversas proteínas formando el complejo proteico inductor de silenciamiento mediante ARN (RISC, por sus siglas en inglés) que reconoce transcritos y los degrada (Dunoyer et al., 2004; Parker et al., 2004). En el segundo, pequeños ARN's de interferencia en conjunto con otras proteínas inducen la metilación de citosinas en el ADN, proceso conocido como metilación de ADN dependiente de ARN (RdMD, por sus siglas en inglés) (Grant-Downton y Dickinson, 2005). No obstante, la metilación de citosinas también puede ser regulado como un proceso independiente. Este proceso es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en plantas (Saze et al., 2012); se ha encontrado que la metilación ocurre en las regiones simétricas CG y CNG, y la región asimétrica CNN del genoma, siendo N: A, C, T o G (Cokus et al., 2008).

Los procesos epigenéticos están involucrados en el desarrollo y respuesta a estreses abióticos en plantas (Wassenegger et al., 1994). En los últimos años, las modificaciones en la metilación del ADN se han investigado ampliamente con el fin de elucidar los mecanismos moleculares que involucran (Saze et al., 2012). La información generada sugiere que la metilación de ADN es un componente del fenómeno epigenético que en la actualidad no ha sido completamente elucidado (Grant-Downton y Dickinson, 2005). De manera general, el aumento en la metilación de ADN (hiper-metilación) de un gen específico reduce o silencia por completo su expresión. Hallazgos más específicos demuestran que la metilación de citosinas en el promotor de un gen inhiben su transcripción, mientras que la metilación en la región codificante no lo hace (Zhang et al., 2010).

Los estudios enfocados en la evaluación de la estabilidad epigenética en plantas cultivadas *in vitro* muestran una alta frecuencia de variación en la metilación del ADN. Estas variaciones forman parte del fenómeno de adaptación de las células a diferentes

ambientes e incluyen la respuesta a señales que pueden alterar el desarrollo del organismo. A su vez, estos ajustes adaptativos pueden provocar efectos no deseados en el material vegetal (Miguel y Marum, 2011). Uno de los ejemplos más notables de variación somaclonal inducida por cultivo *in vitro*, es la variación somaclonal observada en palma africana (*Elaeis guineensis*). Esta variación alteró la formación de órganos florales del 5% de las plantas regeneradas a partir de embriogénesis somática y se relacionó con una reducción en el nivel de metilación de ADN (Rival et al., 2008).

Miguel y Marum (2011) en un escrito de revisión enlistan una serie de estudios en los que usando diferentes sistemas de regeneración de plantas se encontraron diferencias en la metilación del ADN en el material vegetal, con la consecuente variación somaclonal. Si bien hay muchos estudios sobre las modificaciones en la metilación del ADN en respuesta al cultivo *in vitro*, en el caso de la crioconservación son escasos.

## II. VI. Cambios en la Metilación de ADN de Plantas Debidos a la Crioconservación

Como se mencionó anteriormente, los estudios muestran que las variaciones genéticas en plantas producidas por la crioconservación son relativamente escasas; sin embargo, las variaciones epigenéticas, específicamente en el patrón de metilación del ADN parecen ser más frecuentes. Esto se puede evidenciar en el trabajo realizado por Channuntapipat y colaboradores (2003), en el que se examinaron los efectos del cultivo *in vitro*, la vitrificación y la crioconservación en la integridad del ADN de meristemos de almendros [*Prunus dulcis* (Miller)]. En este estudio no se detectaron modificaciones en la secuencia de ADN mediante RAPD; sin embargo, si se encontraron alteraciones en la metilación del ADN cuando se evaluó el patrón de bandas resultante de la digestión con enzimas isoesquizómeras sensibles a metilación. Los autores mencionan que los cambios observados están asociados al cultivo *in vitro* y la crioconservación. Asimismo, señalan que es importante analizar las alteraciones epigenéticas en germoplasma, especialmente cuando potencialmente pueden alterar el rendimiento agrícola de un cultivo. Por lo anterior, la elucidación de los mecanismos relacionados con cambios en

la metilación de ADN es crucial para la comprensión de las variaciones fenotípicas en plantas (Miguel y Marum, 2011).

Harding y colaboradores (2000) realizaron un estudio en el que analizaron los cambios en la secuencia de ADN, la estructura de la cromatina y la metilación de ADN en la caoba de Honduras (*Swietenia macrophylla*) criopreservada. Los resultados muestran que no se desarrollaron polimorfismos por efecto de la criopreservación; sin embargo, se observaron diferencias en la estructura de la cromatina y un aumento en la metilación de ADN ribosomal. Los autores concluyeron que existe una correlación entre el patrón de metilación del ADN y los cambios en la estructura de la cromatina y que estos cambios pueden causar alteraciones significativas en la expresión de genes en germoplasma derivado de la criopreservación.

Kaity y colaboradores (2008) evaluaron la capacidad de desarrollo y los cambios en la metilación de ADN utilizando la técnica de amplificación de polimorfismos asociado a la metilación del ADN (AMP-PCR, por sus siglas en inglés) en plántulas regeneradas a partir de meristemos apicales de papaya (*Carica papaya*) que habían sido criopreservados por vitrificación. Los autores reportan que un promedio de 61-73% de los meristemos mostraron capacidad de desarrollo y una variación en la metilación del 0.52 al 6.62%; asimismo, sugieren que estas modificaciones pueden inducir variaciones somaclonales. En otro experimento realizado por el mismo grupo de investigadores, se evaluaron los cambios en la morfología, crecimiento y metilación de ADN en plantas cultivadas *in vitro* y en campo provenientes de meristemos de *C. papaya* previamente criopreservados y vitrificados. En este estudio, se encontró una variación en la metilación de ADN del 0 al 4.3% por efecto del tratamiento con PVS2 y la criopreservación; sin embargo, no se encontraron cambios en el crecimiento, fisiología o morfología de las plántulas (Kaity et al., 2009).

En un estudio similar, Peredo y colaboradores (2008) evaluaron la estabilidad en la metilación de ADN en plantas de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) regeneradas de un protocolo de criopreservación. La metilación de ADN se analizó mediante amplificación

de fragmentos de ADN con variaciones en metilación (MSAP, por sus siglas en inglés) encontrando que el 36% de los *loci* evaluados mostraron alteraciones relacionadas en su mayoría con eventos de demetilación. Wang y He (2009) analizaron el poder de regeneración en medio de cultivo y los cambios en la metilación de ADN por MSAP en plántulas de *A. thaliana* tratadas con crioprotectores y crioconservadas. En este estudio se observó una regeneración del 98% en plantas que fueron tratadas con crioprotectores sin crioconservar, con una reducción del 4.2% después ser crioconservadas. Las plantas no mostraron alteraciones morfológicas en medio de cultivo 20 días después de la criopreservación; sin embargo, se observó la aparición de metilaciones *de novo* y demetilaciones en el ADN de las plántulas en respuesta al tratamiento con crioprotectores y la criopreservación.

En un trabajo más reciente, Mikula y colaboradores (2011) evaluaron los cambios en la metilación de ADN mediante la técnica de fragmentos amplificados mostrando polimorfismo de tamaño asociados a la metilación (met-AFLP, por sus siglas en inglés) en plantas regeneradas a partir de suspensión celular de genciana estrella (*Gentiana cruciata* (L.) criopreservados a corto y largo plazo. En contraste con lo reportado por Wang y He (2009), dichos autores no encontraron cambios en la metilación un año y medio después de la criopreservación. Johnston y colaboradores (2009) evaluaron la metilación de ADN por efecto de la criopreservación en meristemas apicales de distintas especies del arbusto nativo perteneciente al género *Ribes* registrando un aumento en la metilación en genotipos tolerantes a la criopreservación y una disminución en los sensibles. Dichos autores observaron que en la especie tolerante *R. nigrum* la metilación de ADN se incrementó de manera gradual después de cada etapa sucesiva durante el proceso de criopreservación.

Estos experimentos indican que hay variación en la metilación del ADN del material vegetal y que estos pueden ocurrir en las distintas etapas del proceso de criopreservación. Esta variación parece ser específica dependiendo de la especie, material vegetal y técnica de criopreservación utilizada. La metilación del ADN altera los procesos genéticos de la célula (replicación, transcripción y recombinación) y está



involucrada en la diferenciación celular, silenciamiento de elementos de transposición y expresión de genes en respuesta celular a estímulos externos (Vanyushin, 2005). Los cambios en la metilación pueden dar origen a alteraciones funcionales de fenómenos complejos; por lo tanto, su control se considera indispensable para el desarrollo normal de las plantas (Zhang et al., 2010). Las enzimas encargadas de este mantenimiento son las 5-citosina ADN metiltransferasas (ADNMET's).

## II. VII. Participación de las ADN Metiltransferasas en las Modificaciones Epigenéticas en Plantas y su Regulación en la Crioconservación por Vitrificación

La metilación del ADN se realiza por la actividad enzimática de las ADN metiltransferasas (ADNMET's). En plantas, estas enzimas se clasifican dentro de tres familias: 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1 (MET1), 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados (DRM) y la 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina (CMT) (Dai et al., 2005). MET1 y CMT son ADNMET's de mantenimiento, las cuales metilan sitios hemimetilados del ADN durante la replicación celular; principalmente en sitios simétricos CG y CNG, respectivamente (Lindroth et al., 2001). DRM es una familia de ADNMET's *de novo*, encargadas de establecer un patrón de metilación diferente (y no de mantener uno ya existente); principalmente en sitios asimétricos CNN del ADN (Cao y Jacobsen, 2002).

Actualmente, se sabe que estas enzimas están involucradas en procesos de crecimiento y desarrollo en plantas, específicamente en eventos de división y diferenciación celular; existen varios estudios de expresión de genes que soportan esta aseveración. Tal es el caso de los estudios realizados en zanahoria, arroz y durazno, en los que se encontró que en división celular aumentan los niveles en la expresión de los genes codificando ADNMET's *MET1* y *MET2*; *OsMET1-1* y *OsMET1-2*; y *PpMET1*, respectivamente (Bernacchia et al., 1998; Giannino et al., 2003; Teerawanichpan et al., 2004). De acuerdo a lo mencionado, Solís y colaboradores (2012) evaluaron la relación entre los patrones de metilación del ADN y la expresión de un gen que codifica para una

ADNMET (*BnMET1a*) en *Brassica napus* L. Los autores reportan cambios en la abundancia y distribución de transcritos de *BnMET1a* durante el desarrollo del polen y la embriogénesis y mencionan que estos correlacionan directamente con las variaciones en la metilación de ADN (Solís et al., 2012).

En un estudio similar, se analizó la expresión de cinco genes de ADNMET (*TaMET1*, *TaMET2a*, *TaMET2b*, *TaCMT* y *TaMET3*) en distintas etapas en el desarrollo del trigo. Este estudio reveló que los cinco genes mostraron cambios en su nivel de expresión durante el desarrollo de semillas, germinación y en tejidos vegetativos. Los autores concluyen que los genes ADNMET y consecuentemente la metilación del ADN es un fenómeno muy importante en el desarrollo y crecimiento normal del trigo (Dai et al., 2005). De acuerdo a estos resultados, Malik y colaboradores (2012) usaron el inhibidor de las enzimas ADNMET zebularina con el fin de observar las consecuencias en el desarrollo del musgo *Physcomitrella patens*. La aplicación de dicho inhibidor causó una disminución en el nivel de metilación del genoma y se observó un crecimiento y una diferenciación celular aberrante en el desarrollo de *P. patens*.

Steward y colaboradores (2000) reportan que la expresión de *ZmMET1*, un gen que codifica para una ADNMET en maíz, incrementa en células en división celular y disminuye durante el estrés por frío. Lo anterior sugiere que el estrés induce cambios en la expresión de estos genes ocasionando probablemente alteraciones en el patrón de metilación. Los estudios descritos sugieren que los cambios en la metilación del ADN observados en el material vegetal pueden ser consecuencia de activación o inactivación de genes ADNMET por efecto de la crioconservación. En relación a esto, Grant-Downton y Dickinson (2005) mencionan que la temperatura influye en la regulación de los mecanismos epigenéticos en un organismo y que la actividad de las ADNMET's podría mostrar sensibilidad a los cambios de temperatura.

En un estudio reciente, Zeng y colaboradores (2014), evaluaron la expresión de genes que participan en mecanismos de regulación epigenética en espermatozoides crioconservados de jabalí (*Sus scrofa*) mediante transcripción reversa PCR cuantitativa (qRT-PCR, por sus siglas en inglés). Los autores mencionan que la crioconservación y el

tratamiento con crioprotectantes inducen cambios epigenéticos importantes en las células evaluadas; particularmente, reportan una disminución en la expresión de genes que codifican para ADNMET de mantenimiento y *de novo* en mamíferos (*Dnmt3a* y *Dnmt3b*, respectivamente). En un estudio similar, al evaluar la expresión de transcritos codificando *Dnmt1*, una ADNMET de mantenimiento, en ovocitos de ratón vitrificados, se encontró una disminución en la expresión de *Dnmt1* por efecto de la vitrificación (Zhao et al., 2013).

Por otra parte, Aksu y colaboradores (2012) realizaron un ensayo mediante microarreglos en el que evaluaron la expresión diferencial de genes inducida por la vitrificación en embriones bovinos. En este trabajo, se encontraron 121 genes diferencialmente expresados por efecto de la vitrificación, con una sobre-expresión de genes involucrados en respuesta al estrés. En plantas, los estudios que evalúan la expresión diferencial de genes por efecto de la crioconservación y vitrificación son menos frecuentes. En otro trabajo mediante microarreglos, se observó que el tratamiento con crioprotectantes y la exposición a nitrógeno líquido generan cambios en la expresión de genes en meristemas apicales de *Arabidopsis* (Volk, 2010). Sin embargo, aún no se cuenta con estudios que hayan evaluado los cambios en la expresión de transcritos que codifican para ADNMET's producidos por efecto de la crioconservación por vitrificación en plantas, lo cual es importante para apoyar en la elucidación de los cambios epigenéticos en organismos vegetal en respuesta a factores extrínsecos.

Como ya se mencionó, la regulación del estado de metilación del ADN, se considera indispensable para el desarrollo normal de una planta, por lo que alteraciones en los mecanismos moleculares de control puede dar origen a consecuencias fenotípicas graves (Zhang et al., 2010). Por todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar los cambios en la expresión de genes codificando ADNMET's en *V. vinifera*, utilizando como modelo de estudio la vitrificación y crioconservación de embriones cigóticos de uva de la variedad 'Red Globe', cultivada en el estado de Sonora. Asimismo, se evaluó el efecto de la aplicación de las técnicas mencionadas en la viabilidad y capacidad de desarrollo de los embriones. Se espera que los resultados

obtenidos ayuden en la elucidación de los mecanismos de respuesta epigenética a estreses abióticos en plantas.

### **III. HIPÓTESIS**

La crioconservación por vitrificación produce cambios en la expresión de genes codificando ADN metiltransferasas (ADNMET's) en embriones cigóticos de uva (*Vitis vinifera*).

## IV. OBJETIVOS

### IV. I. Objetivo General

Evaluar el efecto de la vitrificación y crioconservación sobre la expresión de genes codificando ADNMET's en embriones cigóticos de uva (*V. vinifera*) variedad 'Red Globe'.

### IV. II. Objetivos Específicos

- 1.- Establecer un protocolo de crioconservación por vitrificación para embriones cigóticos de uva cultivar 'Red Globe'.
- 2.- Evaluar la viabilidad de embriones cigóticos de uva cultivar 'Red Globe' crioconservados mediante vitrificación.
- 3.- Aislar y secuenciar fragmentos de genes codificando enzimas ADNMET's de embriones cigóticos de uva (*V. vinifera*) cultivar 'Red Globe'.
- 4.- Analizar los cambios en la expresión de los genes aislados codificando enzimas ADNMET's en embriones cigóticos de uva crioconservados mediante vitrificación.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V. I. Establecimiento del Protocolo de Crioconservación por Vitricación**

#### **V. I. I. Material Vegetal**

El experimento se realizó en embriones cigóticos de uva de la variedad 'Red Globe'. Las bayas fueron proporcionadas por la Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa de Hermosillo, Sonora (AALPUM). Se trasladaron al laboratorio y se lavaron superficialmente antes de extraer las semillas, las cuales se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

#### **V. I. II. Vitricación y Crioconservación**

Antes de ser utilizadas, las semillas se trataron con 1000 ppm de ácido giberélico (AG3) durante 24 horas a 25°C. Inmediatamente después del tratamiento con AG3, se esterilizaron superficialmente con etanol (70%) durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (1.5%) durante 7 minutos. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril.

En campana de flujo laminar horizontal, con ayuda de un microscopio estereoscopio y bisturí estéril se diseccionaron las semillas, se extrajeron los embriones y se colocaron en criotubos estériles de 1.5 ml para ser vitricados con la solución PVS2 [30% (w/v) glicerol, 15% (w/v) etilenglicol y 15% (w/v) DMSO en medio Murashige y Skoog (MS)

con 0.4 M sacarosa] a un pH de 5.8 (Marković et al., 2013). Las condiciones de vitrificación fueron previamente reportadas por Lazo-Javalera y colaboradores (2014) y Matsumoto y Sakai (2003). Se evaluaron diferentes tiempos de vitrificación, temperatura y concentración de PVS2, de acuerdo al **Cuadro 1**

**Cuadro 1.** Descripción de las condiciones utilizadas para cada uno de los tratamientos de vitrificación evaluados.

Tratamiento	Condiciones	
	Minutos en PVS2 al 50% a 25°C	Minutos en PVS2 al 100% a 4°C
V1 (Lazo-Javalera et al., 2014)	0	180*
V2	60	120
V3	60	60
V4 (Matsumoto y Sakai, 2003)	50	30
V5	10	10
V6	5	5
V7	1	1

\*Vitrificación realizada a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el tiempo de vitrificación, se eliminó el excedente de PVS2 de los criotubos que contenían los embriones y se sumergieron en nitrógeno líquido (NL). Los embriones fueron descongelados a 40°C en baño de agua por 2 min. y rehidratados en una solución de sacarosa 1.2 M a temperatura ambiente. Para el tratamiento de crioconservación se evaluaron los tratamientos de media hora (Mh), una hora (H), dos horas (2H) un día (D), una semana (S) y un mes (M), así como la respuesta inmediata de los embriones a la congelación (N). Se utilizaron como testigo positivo embriones sin vitrificar y sin crioconservar (T+) y como testigo negativo embriones sin vitrificar crioconservados durante media hora (T-).



### **V. I. III. Análisis de Viabilidad**

Para los embriones sin vitrificar y sin crioconservar (T+), así como los vitrificados con los tratamientos V1, V2, V3, V4, sumergidos 10 segundos en nitrógeno líquido (N) y crioconservados durante una hora (H), un día (D), una semana (S) y un mes (M) se realizó un análisis de viabilidad (por triplicado) mediante el protocolo descrito por De Souza y colaboradores (2012), con modificaciones descritas a continuación. Los embriones se colocaron sobre papel filtro impregnado con 5 ml de solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% dentro de cajas petri y se incubaron a 30°C por 24 horas en oscuridad. Posteriormente, se eliminó la solución de TTC y se lavaron con agua destilada estéril, se colocaron en etanol (95%) durante 10 min. a una temperatura de 80°C en oscuridad. Transcurrido el tiempo se dejaron enfriar, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante para medir absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro. Los valores se expresaron en porcentajes de viabilidad calculados como indica la siguiente fórmula (1):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Abs}_{530} \text{ de la muestra}}{\text{Abs}_{530} \text{ de T+}} (100) \quad (1)$$

### **V. I. IV. Regeneración de Plántulas**

En campana de flujo laminar horizontal, previamente esterilizada con etanol (70%) e hipoclorito de sodio (1.5%), los embriones sin vitrificar y sin crioconservar (T+) y vitrificados (Tratamientos V1-V7) fueron colocados en medio de cultivo para inducir germinación. El medio de germinación de embriones contiene los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas del medio MS (Larkin et al., 2007) suplementado con 0.035 mg de ácido giberélico, 50 mg de mio-inositol, 50 mg de hidrolizado de caseína, 30 g de sacarosa, 8 g de agar y 3 g de carbón activado por litro de agua deionizada. Los embriones fueron mantenidos en incubación a 26°C con un fotoperiodo de 16 horas luz

y 8 de oscuridad por un tiempo mínimo de 6 semanas en una cámara de crecimiento. Embriones vitrificados con los tratamientos V5 y V7 fueron crioconservados durante media hora en nitrógeno líquido (V5-Mh y V7-Mh) y colocados en medio de cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente. Los resultados se expresaron en porcentajes de regeneración, mediante una modificación del análisis estadístico descrito por Marković y colaboradores (2013), tomando como unidad experimental 12 embriones cigóticos, analizados por duplicado.

## V. II. Aislamiento de Fragmentos de Genes Codificando Enzimas ADNMET

### V. II. I. Diseño de Oligonucleótidos

Se analizaron secuencias de genes que codifican para ADNMET's de *A. thaliana* (NM\_124293.3), *Fragaria ananassa* (FJ804059.1; FJ804058.1) y transcritos predichos computacionalmente de *V. vinifera* (XM\_002267164.1; XM\_002267248.2; XM\_002268202.2; XM\_002273936.2; XM\_002264190.1; XM\_002283319.2) disponibles en la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) con el programa ClustalW (Sambrook y Russell, 2006). Esto se hizo con el objetivo de identificar regiones conservadas para diseñar oligonucleótidos específicos (**Cuadro 2**). Los oligonucleótidos se analizaron con el programa “Oligo Analyzer 3.1” de “Integrated DNA technologies” ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) para calcular la temperatura de alineamiento, porcentaje de G-C, formación de estructuras secundarias internas y dímeros.

**Cuadro 2.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de ADNc codificando ADNMET de embriones cigóticos de *V. vinifera*.

Nombre	Dirección	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (bases)
DRM1 F	Sentido	CAGGTGGCATCACTCTCTTATC	22
DRM1 R	Antisentido	TCATCCAGCAGCCTTTCATC	20
DRM2 F	Sentido	CAGCAGAGAGACATCCTTCATC	22
DRM2 R	Antisentido	TCCAGTATTATGCCACCACTTC	22
MET1 F	Sentido	TATTTGCTGGTTGTGGTG	18
MET1 R	Antisentido	CTCACCTGATAACCCATTTC	20
MET1-2 F	Sentido	GAGCAAAGTTCAGTGTGAAATGAT	24
MET1-2 R	Antisentido	GCTCCGAACAGCAGCATA	18
CMT3F	Sentido	AGGTCCTCCATGTCAAGG	18
CMT3R	Antisentido	GGCGATGGTCATAAAGCA	18

**DRM1F** y **R**: Oligonucleótidos para amplificar el gen de la 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados tipo 1. **DRM2F** y **R**: Oligonucleótidos para amplificar el gen de la 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados tipo 2. **MET1F**, **MET1R**, **MET1-2F** y **MET1-2 R**: Oligonucleótidos para amplificar genes de la 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1. **CMT3F** y **R**: Oligonucleótidos para amplificar el gen de la 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina tipo 3.

## V. II. II. Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc

Embriones extraídos, de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente, fueron colocados en microtubos estériles de 1.5 ml y pulverizados con micropistilos para extraerles el ARN total utilizando el ‘RNeasy plant mini kit’, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAGEN México, D.F.). Se determinó la pureza, concentración e integridad del ARN total mediante cuantificación espectrofotométrica en NanoDrop ND-1000 UV-Vis y electroforesis en gel de agarosa en buffer TAE al 1% teñido con gel red, visualizándolo con luz U.V. en un transiluminador. Se registraron los resultados de la electroforesis mediante un fotodocumentador digital. Posteriormente, se realizó la estandarización de la retro-transcripción del ARN amplificando el ARNm a 17, 20, 23 y 26 ciclos para identificar el ciclo óptimo de amplificación y evitar sobre-amplificación, según lo indica el kit ‘SMARTer PCR cDNA synthesis kit’ (Clontech Laboratories USA, CA).

### **V. II. III. Amplificación, Secuenciación y Análisis a Nivel de Aminoácidos**

A partir del ADNc y utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados, se realizó la estandarización de la amplificación mediante PCR con gradiente de temperatura; variando la temperatura de alineamiento, concentración del DNAc y de oligonucleótidos hasta la obtención de amplicones específicos sin la formación de dímeros de oligonucleótidos. La reacción de PCR se realizó siguiendo las especificaciones descritas en el kit “GoTaq PCR Core System II” de Promega en un volumen total de 25 microlitros. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización durante 5 min. a 95°C con 35 ciclos de 45 seg. a 95°C, 45 seg. a 57-65°C, 1 min. a 72°C y una extensión final de 3 min. a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa en las condiciones mencionadas anteriormente y se enviaron a secuenciar al laboratorio de secuenciación de “MACROGEN Corp. Seoul, Korea. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el algoritmo Blastx (Altschul et al., 1997) disponible en la página web del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con un valor E de 1e-06.

### **V. III. Análisis de Expresión de Genes Codificando Para Enzimas ADNMET**

#### **V. III. I. Extracción de ARN Total y Diseño de Oligonucleótidos**

Utilizando las secuencias de los fragmentos de ADNc, se diseñaron oligonucleótidos específicos para qRT-PCR usando el programa “PrimerQuest” de “Integrated DNA technologies” ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Posteriormente, se extrajo el ARN total de los embriones vitrificados con los tratamientos V5 y V7 sin crioconservar y crioconservados durante media hora (V5-Mh y V7-Mh) y dos horas (V5-2H y V7-2H), así como de los embriones testigo (T+). El ARN se extrajo utilizando el kit para extracción de ARN ya

mencionado y realizando las pruebas de concentración, pureza e integridad descritas con anterioridad.

### **V. III. II. Cuantificación de Expresión de Transcritos Codificando ADNMET**

Se realizó un análisis de expresión relativa ( $\Delta\Delta C_t$ ) por qRT-PCR con el kit “Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix kit, 1 step (Agilent Technologies)” en un termociclador ‘StepOne™ Real Time PCR System de Applied Biosystems. El ARNm extraído de embriones sin vitrificar y sin crioconservar (T+) se consideró como calibrador y el gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *V. vinifera* como gene constitutivo. Para la cuantificación de la expresión del gen constitutivo se usaron los oligonucleótidos VvGAPDH-F y VvGAPDH-R propuestos por Reid y colaboradores (2006) que se incluyen en el **Cuadro 3**.

Las condiciones de reacción fueron las especificadas en el kit “Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix kit, 1 step (Agilent Technologies)” con 10 pmoles de oligonucleótidos y 50 ng de ARN total en una reacción de 25 microlitros. La cuantificación se realizó por duplicado incluyendo controles negativos sin templado para cada uno de los transcritos evaluados. Asimismo, se construyó una curva de disociación para verificar la especificidad de amplificación de los oligonucleótidos y se analizó la eficiencia de amplificación respecto al gen endógeno para cada uno de los genes.

**Cuadro 3.** Oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión de los genes parciales codificando ADNMET y para el gene endógeno utilizado para normalizar.

Nombre	Dirección	Secuencia 5' - 3'	Tamaño en bases
D1-F	Sentido	TGCAGATGTGCAGCAGTT	18
D1-R	Antisentido	GCTCCCACCAACAATGAGAT	20
M1-2F	Sentido	GTTTCCGGGACTGAGAACT	20
M1-2R	Antisentido	GGACAGACATTCCGTCTAACTC	22
VvGAPDH-F	Sentido	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	21
VvGAPDH-R	Antisentido	CCACAGACTTCATCGGTGACA	21

**D1F y R:** Oligonucleótidos diseñados para cuantificar la expresión del gen *DRM1*. **M1 2F y R:** Oligonucleótidos diseñados para cuantificar la expresión del gen *MET1-2*. **VvGAPDHF y R:** Oligonucleótidos diseñados para cuantificar el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *V. vinifera*.

#### V. VI. Análisis Estadístico

Los datos se analizaron en base a un diseño completamente al azar y un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar como variables respuesta la viabilidad y expresión relativa de genes codificando ADNMET's. Se consideró como factor el tiempo y la concentración de PVS2 en las condiciones de vitrificación y crioconservación utilizadas. Se realizó una prueba de comparación de medias por el método de Fisher (LSD) con el programa NCSS 2007 para los resultados de viabilidad y una prueba de Dunnett con el programa GenEx 6 para los resultados de expresión relativa de genes. Todo lo anterior con un 95% de confianza.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI. I. Efecto de la Vitricación y Crioconservación sobre la Viabilidad

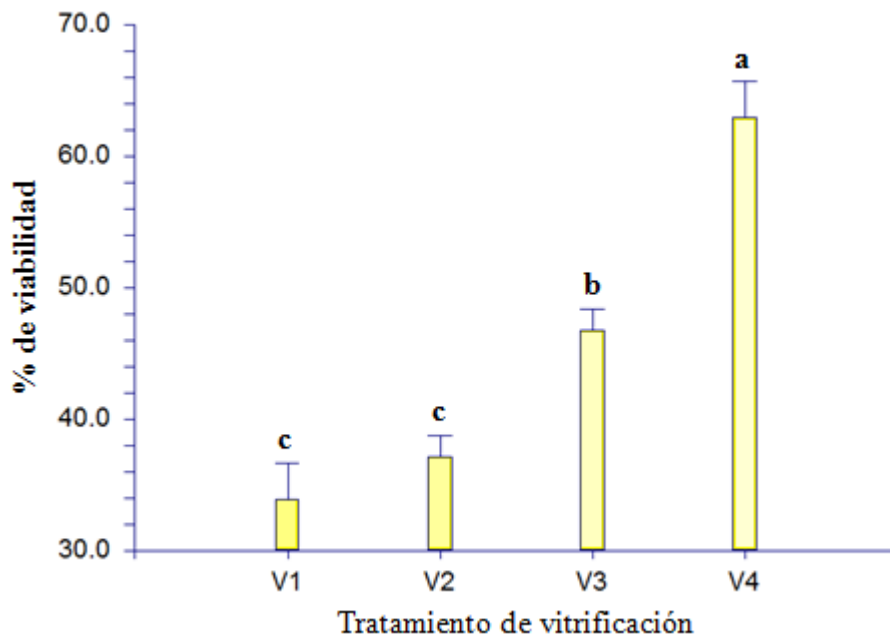
El análisis de viabilidad por reducción de sales de TTC permite concluir que el tratamiento de vitricación V4 fue el que mostró mayor porcentaje de viabilidad ( $62.92\% \pm 2.79$ ), siendo estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) al tratamiento V3 que mostró un porcentaje de  $46.75\% \pm 1.64$ . (**Figura 1**). Lazo-Javalera y colaboradores (2014) reportan que al vitricar con PVS2 yemas axilares de *V. vinifera* cv. 'Flame Seedless' durante 180 min. obtuvieron 90% de viabilidad y observaron que esta se incrementa al aumentar el tiempo de incubación en PVS2. En contraste a lo reportado por Lazo-Javalera y colaboradores (2014), en el presente estudio se observa una disminución en la viabilidad de los embriones al aumentar el tiempo de vitricación. De acuerdo a esto, los tratamientos V1 y V2 que permanecieron mayor tiempo en la solución PVS2, fueron los que resultaron con menores porcentajes de viabilidad ( $33.88\% \pm 2.79$  y  $37.1\% \pm 1.61$ , respectivamente), sin encontrarse diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Lo anterior se puede deber a los tejidos que forman las yemas axilares, ya que estas cuentan con tejidos que protegen el tejido meristemático haciendo más lenta la penetración de soluciones crioprotectantes y permitiéndoles resistir más tiempo al tratamiento con PVS2 (Almanza et al., 2010). Los resultados observados en el presente trabajo claramente sugieren que los embriones cigóticos de *V. vinifera* son más susceptibles al tratamiento con PVS2 que las yemas axilares de la misma especie. Es evidente, como aseguran Marković y colaboradores (2013), que los tiempos óptimos de exposición a PVS2 están asociados al tamaño y la estructura del tejido utilizado.

La solución PVS2, por su elevada concentración, puede inducir plasmólisis debido a la alta presión osmótica causando daño al material vegetal. Matsumoto y Sakai (2003) argumentan que este daño se puede prevenir mediante una vitrificación en dos pasos tratando previamente al material vegetal con soluciones menos concentradas. En este sentido, los investigadores mencionados realizaron un experimento en el que vitrificaron ápices axilares de *V. vinifera* primero con una solución de PVS2 al 50% durante 50 min. y después con PVS2 al 100% durante 30 min., con lo que obtuvieron una mayor viabilidad (80%) en comparación con la vitrificación al 100% durante 80 minutos.

La vitrificación en dos pasos aplicada en el presente estudio (60 min. en PVS2 al 50% y 120 min. en PVS al 100%) no aumentó la viabilidad de los embriones respecto al tratamiento en un paso con el mismo tiempo de vitrificación (180 min. en PVS2 al 100%). Los resultados sugieren que la disminución en la viabilidad observada en los tratamientos V1 y V2 se debió al tiempo prolongado de exposición a PVS2 y no a la exposición del tejido a la solución (**Figura 1**).





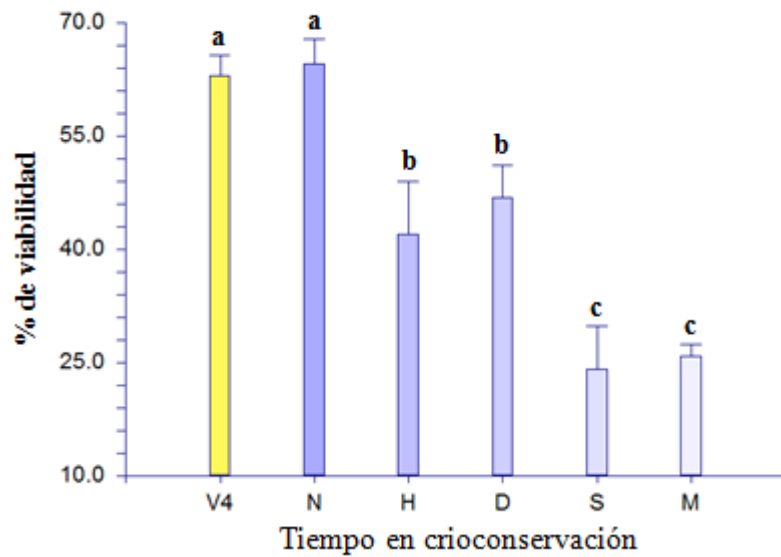
**Figura 1.** Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de embriones cigóticos de uva. **V1:** 180 minutos en PVS2 al 100% a 25°C. **V2:** 60 minutos en PVS2 al 50% a 25°C y 120 minutos en PVS2 al 100% a 0°C. **V3:** 60 minutos en PVS2 al 50% a 25°C y 60 minutos en PVS2 100% a 0°C. **V4:** 50 minutos en PVS2 al 50% a 25°C y 30 minutos en PVS2 al 100% a 0°C. Las barras corresponden a la media  $\pm$  error estándar. Literales distintas sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la viabilidad de los embriones vitrificados (V4) sin crioconservar ( $62.92\% \pm 2.79$ ) con los tratamientos de crioconservación, se encontró que la inmersión directa en nitrógeno líquido ( $64.53\% \pm 3.22$ ) no afecta la viabilidad de los embriones ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al aumentar el tiempo de crioconservación a una hora (H) y un día (D) la viabilidad disminuyó a  $41.94\% \pm 7.03$  y  $46.78\% \pm 4.63$ , respectivamente ( $p < 0.05$ ). Mas aún, la crioconservación durante una semana (S) y un mes (M) redujo aún más ( $p < 0.05$ ) el porcentaje de viabilidad de los embriones ( $24.4\% \pm 4.46$  y  $25.81\% \pm 4.46$ , respectivamente).

Ishikawa y colaboradores (1997) reportan porcentajes de viabilidad similares a los observados en el tratamiento H ( $41.94\% \pm 7.03$ ) al vitrificar embriones cigóticos de *Bletilla striata* con PVS2 durante 60 min. y crioconservados por media hora (40% de viabilidad medida mediante el método de reducción de TTC). Cabe mencionar que en

dicho estudio los tratamientos de descongelación (descongelamiento en baño de agua a 37°C y rehidratación en solución de sacarosa 1.2 M) fueron similares a los aplicados en el presente trabajo. Los autores reportaron que al aumentar el tiempo de vitrificación a 180 min. la viabilidad aumentó casi al 60%. Sin embargo, en este trabajo se observó una reducción de 33% en la viabilidad de los embriones de *V. vinifera* a un tiempo de vitrificación de 180 min.

Los embriones cigóticos de *V. vinifera* parecen ser más susceptibles a la vitrificación y crioconservación incluso que embriones cigóticos de otras especies. Kartha (1985) argumenta que embriones extraídos de semillas recalcitrantes pueden ser deshidratados para su crioconservación; no obstante, esto compromete su viabilidad. En relación a esto, Wang y colaboradores (2004) sostienen que la variedad de uva 'Red Globe' resulta recalcitrante, por lo que la reducción de la viabilidad observada en tratamientos muy prolongados puede deberse a las condiciones fisiológicas en las que se encuentran los embriones. Por otra parte, Kartha (1985) argumenta que si un tejido vegetal determinado puede ser congelado a temperaturas de nitrógeno líquido y descongelado conservando su viabilidad, el tiempo que dure en crioconservación no debe afectarla. Sin embargo, al observar los resultados de reducción de TTC en el presente estudio (**Figura 2**) se observa claramente que el aumento en el tiempo de crioconservación disminuye la viabilidad de los embriones.

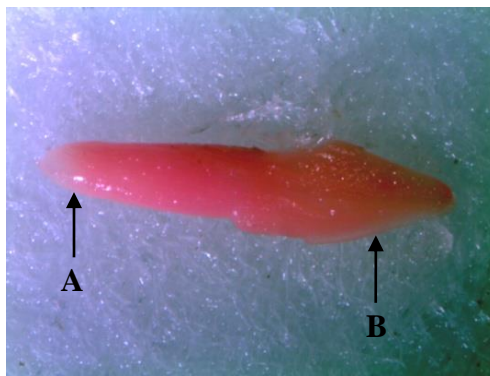


**Figura 2.** Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad de embriones cigóticos de uva. **V4:** Vitrificados durante 50 minutos en PVS2 al 50% a 25°C y 30 minutos en PVS2 al 100% a 0°C. **N:** Vitrificados con las condiciones V4 y sumergidos 10 seg. en nitrógeno líquido. **H, D, S y M:** Vitrificados con las condiciones V4 y crioconservados durante una hora, un día, una semana y un mes, respectivamente. Las barras corresponden a la media  $\pm$  error estándar. Literales distintas sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El método de reducción de TTC se basa en la actividad de enzimas deshidrogenasas que participan en el camino metabólico de respiración en la mitocondria, que reducen el TTC a un compuesto de coloración roja. Consecuentemente, los cambios en la cantidad del compuesto colorido formado (formazán) medidos mediante espectrofotometría indican cambios en la viabilidad del material vegetal (Steponkus y Lanphear, 1967). Esta técnica es considerada un método rápido y preciso para medir viabilidad en tejidos crioconservados (Verleysen et al., 2004); recomendado y aplicado por la Asociación Internacional para la Evaluación de Viabilidad de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés) (de Souza et al., 2012). Sin embargo, una disminución en la formación de formazán en respuesta a daño por frío o temperaturas ultra-bajas podría deberse a una disminución de los cofactores y sustratos de las enzimas deshidrogenasas (Steponkus y Lanphear, 1967). La disminución en la reducción de TTC observada al aumentar los

tiempos de criopreservación en el presente estudio, podría deberse a la disminución de los factores mencionados y no a una disminución de la viabilidad en sí..

La **Figura 3** muestra la tinción característica causada por la reducción de sales de TTC en un embrión cigótico de *V. vinifera* en fase cotiledonar. Kartha (1985) sostiene que evaluar la viabilidad de embriones únicamente mediante la reducción de TTC es insuficiente. Esto se debe a que los embriones, después de ser criopreservados, pueden experimentar un nivel elevado de stress de tal forma que el metabolismo requiere un cierto período de tiempo para funcionar normalmente. Además, las temperaturas bajas pueden inducir una disminución del metabolismo o dormancia. Por otra parte, la actividad deshidrogenasa evaluada en un tejido vegetal determinado, representa su actividad metabólica y no la capacidad que tendrá de regenerar una planta completa (Kartha, 1985). Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se decidió evaluar la capacidad de los embriones para desarrollar plantas completas en medio de cultivo. De acuerdo a los resultados de viabilidad obtenidos por reducción de TTC, se evaluaron tiempos menores de vitrificación, buscando disminuir el aparente efecto dañino de los tratamientos de vitrificación aplicados.

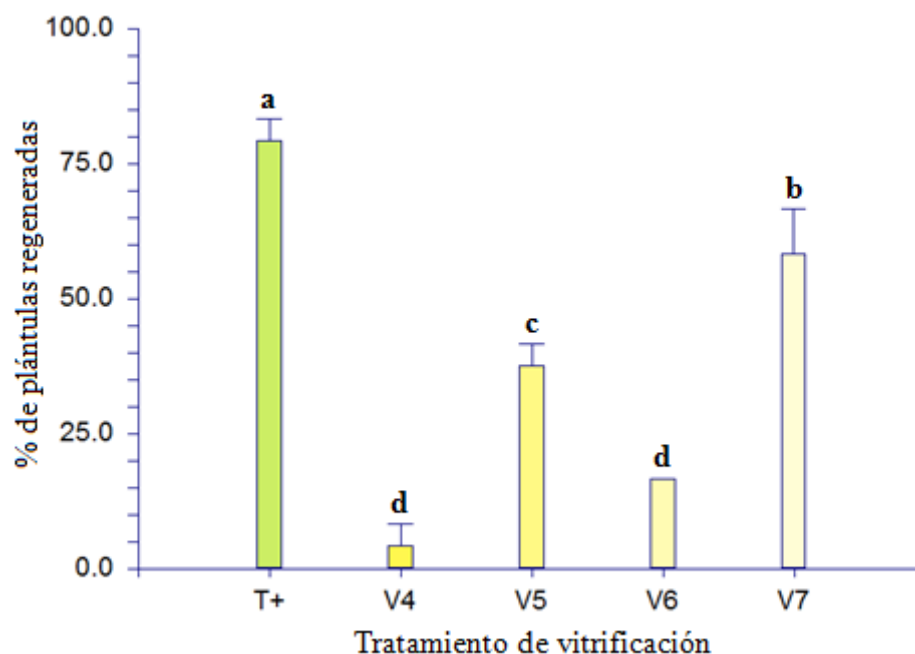


**Figura 3.** Embrión cigótico en fase cotiledonar mostrando la tinción característica de la reducción de sales de TTC. **A:** Radícula. **B:** Cotiledones.

## VI. II Efecto de la Vitricación y Crioconservación sobre el Desarrollo del Embrión

Al inducir el desarrollo de los embriones en medio de cultivo, para los tratamientos de vitricación V1, V2, V3 y V4, se observó que en el tratamiento V4 únicamente se observó el desarrollo de un embrión a plántula ( $4.16\% \pm 4.16$  de regeneración); reduciendo significativamente ( $p < 0.05$ ) el porcentaje respecto a los embriones sin vitricar y sin crioconservar (T+). Los resultados observados en los tratamientos V1, V2 y V3 concuerdan con lo establecido por Steponkus y Lanphear (1967), quienes definen que una reducción mayor al 50% en el nivel de reducción de sales de TTC respecto al testigo positivo (T+) corresponde a una pérdida en la viabilidad en los tejidos. Los porcentajes de plántulas regeneradas con los tratamientos de vitricación V5, V6 y V7 ( $37.49\% \pm 4.16$ ,  $16.66\% \pm 0$  y  $58.33\% \pm 8.33$ , respectivamente) fueron mayores ( $p < 0.05$ ) que los obtenidos con los tratamientos V1-V3. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre V4 y V6 ( $p > 0.05$ ). Estos resultados, corroboran los hallazgos encontrados por el método de reducción de TTC; y claramente demuestran que el tiempo de vitricación es crítico para evitar daños al tejido embrionario (**Figura 4**).

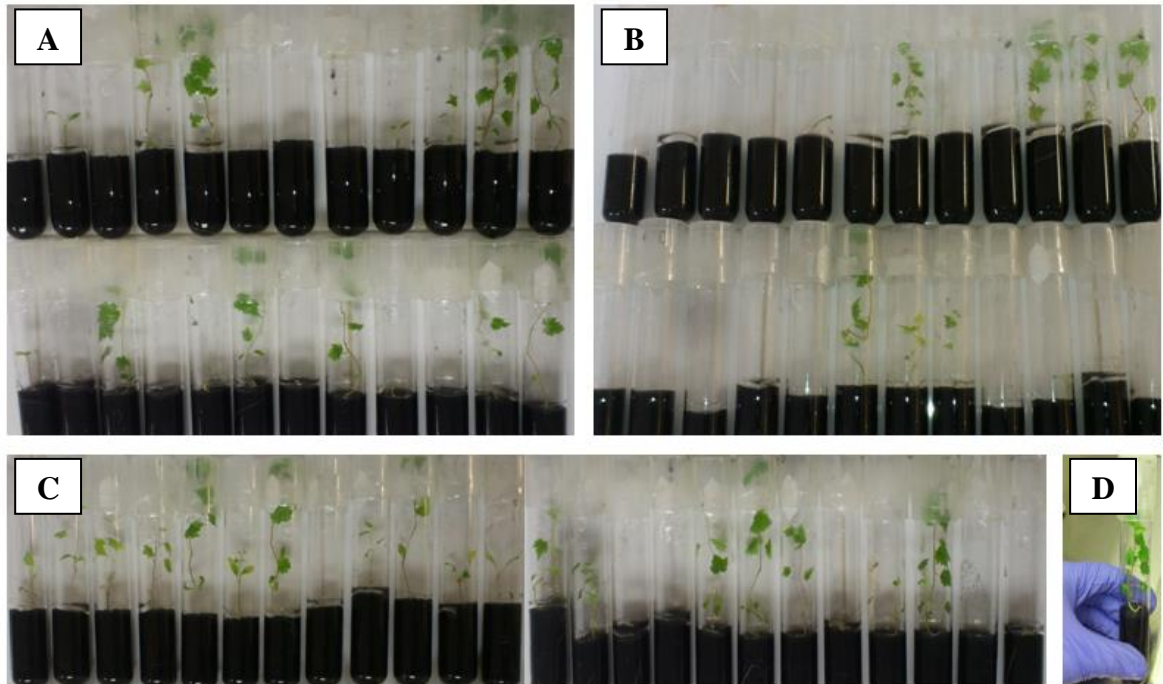
Ganino y colaboradores (2012) encontraron que al vitricar con PVS2 meristemos apicales de *Vitis Berlandieri*  $\times$  *V. riparia* durante 30, 60 y 90 min. la supervivencia disminuye a 57, 15 y 0%, respectivamente. Los autores reportan la aparición de plasmólisis dependiente del tiempo de exposición a PVS2. Estos datos son similares a los resultados del presente trabajo y sugiere a la plasmólisis como una de las posibles causas de la disminución en la capacidad de desarrollo de los embriones. Interesantemente, el porcentaje de regeneración del tratamiento V6 en el presente estudio ( $16.66\% \pm 0$ ) fue menor ( $p < 0.05$ ) que V5, a pesar de que en éste último se utilizó la mitad del tiempo para aplicar el tratamiento. Es importante mencionar que los tratamientos de vitricación que resultaron en un mayor número de plántulas regeneradas fueron V5 y V7 (**Figura 4 y 5**); no obstante, ambos fueron menores ( $p < 0.05$ ) que T+ ( $79.16\% \pm 4.16$ ). Por tal motivo, estas condiciones (V5 y V7) fueron usadas para vitricar embriones y evaluar el efecto de la crioconservación sobre su regeneración.



**Figura 4.** Efecto de la vitrificación sobre el desarrollo de embriones cigóticos de *V. vinifera*. **T+**: Testigo positivo sin tratamiento de vitrificación y criopreservación. **V4**: Vitrificados 50 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 30 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **V5**: Vitrificados 10 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 10 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **V6**: Vitrificados 5 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 5 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **V7**: Vitrificados 1 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 1 min. en PVS2 (100%) a 0°C. Las barras corresponden a la media  $\pm$  error estándar. Literales distintas sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al evaluar el efecto de la vitrificación sobre la capacidad de desarrollo de los embriones, el tratamiento V7 mostró mayor porcentaje de recuperación que V5 ( $p < 0.05$ ). Asimismo, el efecto contrario fue observado al criopreservar los embriones cigóticos vitrificados con dichos tratamientos. Es decir, el porcentaje de plántulas obtenidas de embriones criopreservados vitrificados con V7 (Mh-V7) disminuyó ( $p < 0.05$ ) de 58.33%  $\pm$  8.33 a 4.16 %  $\pm$  4.16. Sin embargo, la criopreservación de embriones vitrificados con el tratamiento V5 (Mh-V5) no afectó ( $p > 0.05$ ) su capacidad de desarrollo (29.16%  $\pm$  4.16); resultando la recuperación con el tratamiento Mh-V5 mayor ( $p < 0.05$ ) que con Mh-V7 (**Figura 6**). A pesar de que V7 disminuye en menor grado el poder de regeneración de los embriones cigóticos de *V. vinifera*, el tiempo de vitrificación de este tratamiento no es suficiente para tener un efecto crioprotector. Dicho de otra manera, las condiciones de

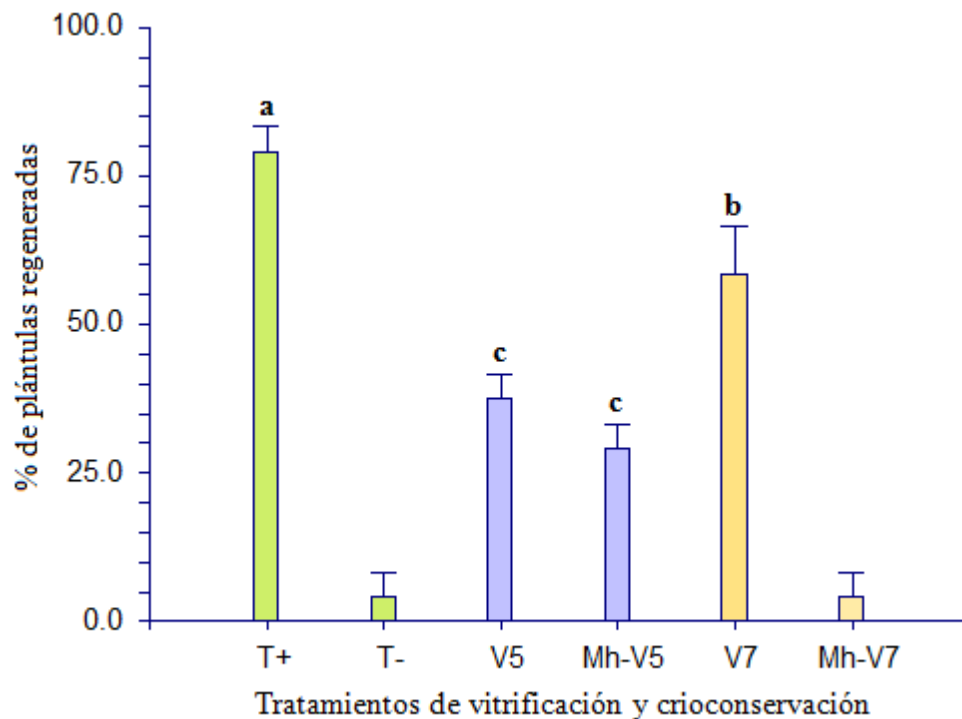
V5 causan mayor toxicidad a los embriones cigóticos de *V. vinifera*, sin embargo, se logra una mayor resistencia al efecto de la crioconservación.



**Figura 5.** Regeneración de embriones cigóticos de *V. vinifera* vitrificados y crioconservados. **A:** Tratamiento de vitrificación V5 sin crioconservar. **B:** Tratamiento de vitrificación V5 con crioconservación (Mh-V5). **C:** Tratamiento de vitrificación V7 sin crioconservar. **D:** Tratamiento de vitrificación V7 con crioconservación (Mh-V7).

Un resultado similar fue obtenido por Marković y colaboradores (2013), quienes reportan que al vitrificar meristemos apicales de *V. vinifera* primero con PVS2 al 50% por 30 min. y posteriormente con PVS2 durante 25, 50 o 70 min., la capacidad de desarrollo de los embriones disminuye con el aumento en los tiempos de vitrificación a 60, 40 y 30%, respectivamente. Sin embargo, después de una hora en crioconservación los meristemos vitrificados durante 50 min. mostraron mayor porcentaje de regeneración (50%) que los demás tratamientos. En un estudio similar realizado por Shatnawi y colaboradores (2011) se observó que el porcentaje de regeneración de meristemos de *V. vinifera* disminuye con el aumento de exposición a PVS2 de 0 a 200 min; no obstante, después de crioconservar, el tiempo intermedio de 40 min. es óptimo para el desarrollo

de los meristemos con un porcentaje de 47.3%. Kartha (1985) sostiene que la vitrificación *per se* disminuye la viabilidad del material vegetal, sin embargo, hace posible su conservación a temperaturas ultra-bajas, permitiendo la regeneración después de la descongelación. Los porcentajes de regeneración obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados en vitrificación y crioconservación de otros tejidos de la misma especie.



**Figura 6.** Efecto de la vitrificación y crioconservación sobre el desarrollo de embriones cigóticos de *V. vinifera*. **T+**: Embriones sin vitrificar y sin crioconservar. **T-**: Embriones crioconservados durante 30 min. sin vitrificar. **V5**: Vitrificados 10 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 10 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V5**: Vitrificados con las condiciones V5 y sumergidos en NL 30 min. **V7**: Vitrificados 1 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 1 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V7**: Vitrificados con las condiciones V7 y sumergidos en NL 30 min. Las barras corresponden a la media  $\pm$  error estándar. Literales distintas sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

No hubo diferencia ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje de plántulas recuperadas entre el tratamiento Mh-V7 y embriones que fueron crioconservados sin vitrificar (T-). Es



necesario mencionar que en el tratamiento T- se observó el crecimiento únicamente de una plántula. De acuerdo a lo anterior, Hassan y Haggag (2013) reportan haber obtenido un 12 y 10% de regeneración de meristemas crioconservados durante una hora sin vitrificar para los cultivares 'Black Matrouh' y 'Bez El-Anza' de *V. vinifera*, respectivamente. Si bien es posible prescindir de la vitrificación para obtener plantas completas después de crioconservar un tejido, esta resulta necesaria para aumentar el número de plantas que pueden desarrollarse a partir de los embriones.

El tratamiento aplicado por Hassan y Haggag (2013) consistió en una vitrificación en dos pasos, con tiempos de exposición similares a los de Mh-V5. Los autores trataron las yemas con PVS2 al 50% por 10-15 min. y posteriormente PVS2 al 100% por 10-20 minutos con una posterior rehidratación en una solución de sacarosa 1.2 M. Se encontraron porcentajes de regeneración y un efecto crioprotector similares a los encontrados con el tratamiento Mh-V5 del presente trabajo; los autores reportan un aumento en la regeneración del 12 al 46.67% y del 10 al 40%, al vitrificar los meristemas antes de crioconservarlos durante una hora.

Como se mencionó anteriormente, la aplicación del tratamiento Mh-V5 permitió obtener plántulas a partir de embriones cigóticos ( $29.16\% \pm 14.16$ ); sin embargo, el porcentaje disminuyó ( $p < 0.05$ ) a más del 40% respecto a los embriones sin vitrificar y sin crioconservar (T+). En relación a esto, Hassan y Haggag (2013) observaron que meristemas sin crioconservar que fueron vitrificados tienen un porcentaje de regeneración menor que aquellos que no recibieron ningún tratamiento, sugiriendo un efecto dañino de la solución de vitrificación. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la disminución en la capacidad del embrión para desarrollar una plántula completa observada en el tratamiento Mh-V5 parece deberse a la exposición a PVS2 y no al mantenimiento en nitrógeno líquido. La tolerancia a la vitrificación y crioconservación es dependiente de la especie y tejido vegetal utilizado.

### VI. III. Transcritos Codificando ADNMET

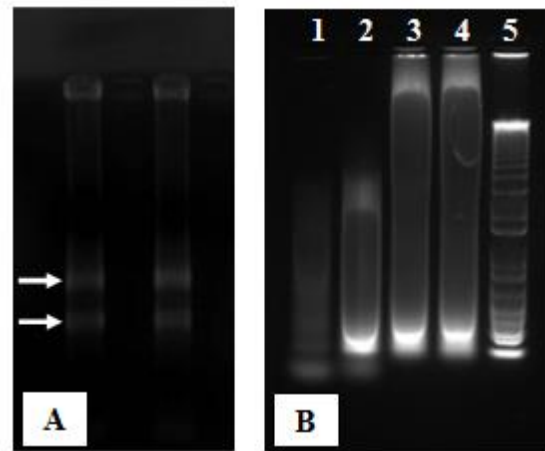
Al analizar las secuencias de genes codificando ADNMET's de *A. thaliana* (NM\_124293.3), *F. ananassa* (FJ804059.1; FJ804058.1) y transcritos predichos computacionalmente de la familia MET1 de *V. vinifera* (XM\_002267164.1; XM\_002267248.2; XM\_002268202.2) se lograron identificar regiones conservadas, a partir de las cuales se diseñaron dos pares de oligonucleótidos. Asimismo, utilizando ARNm predichos computacionalmente de las familias DRM (XM\_002273936.2; XM\_002264190.1) y CMT (XM\_002283319.2) de *V. vinifera* se diseñaron dos y un par de oligonucleótidos, respectivamente. Los tamaños (de 18 a 24 nt), las temperaturas de fusión (tm) (58–65°C) y el contenido de G-C estuvieron dentro del rango establecido para una reacción eficiente y específica (Dieffenbach et al., 1993); excepto para el oligonucleótido M1-2F que posee un contenido de G-C por debajo de 40% (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Características de los oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de ADNc codificando presuntivamente ADNMET's.

Clave del Iniciador	Longitud (nucleótidos)	Tm teórica	Contenido de G-C (%)	Longitud teórica de amplicón	Clave del fragmento de ADNc esperado
D1 F	22	62.6°C	50	556 pb	DRM1
D1 R	20	65.3°C	50		
D2F	22	62.9°C	50	378 pb	DRM2
D2R	22	62.6°C	45.5		
M1F	18	58.0°C	44.4	508 pb	MET1
M1R	20	58.4°C	45		
M1-2F	24	63.2°C	37.5	435 pb	MET1-2
M1-2R	18	62.8°C	55.6		
C3F	18	60.1°C	55.6	590 pb	CMT3
C3R	18	62.3°C	50		

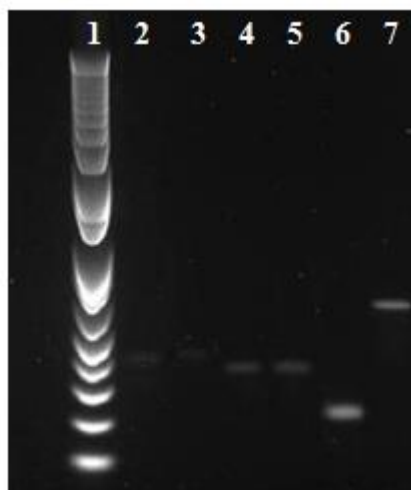
Se logró extraer ARN total a partir de embriones cigóticos con una concentración de 80 ng/μL. Al analizarlo mediante electroforesis en gel de agarosa, este mostró las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (**Figura 7A**). La relación de absorbancia 260/280 obtenida al cuantificar el ARN (1.98) y la intensidad de

las bandas 28S y 18S del ARNr mostradas en el gel evidencian un ARN libre de proteínas y no degradado (Fleige y Pfaffl, 2006). A partir de 80 ng de ARN total, se realizó la estandarización de la síntesis de ADNc, mediante amplificación por PCR acoplada a transcripción reversa a 17, 20, 23 y 26 ciclos. Como resultado, se observó sobre-amplificación a los 23 y 26 ciclos, por lo que 19 son los ciclos óptimos para la síntesis del ADNc (**Figura 7-B**).



**Figura 7.** Análisis de ARN y ADNc por electroforesis en gel de agarosa. **A:** ARN total de embriones cigóticos; las flechas indican las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal. **B:** Síntesis de ADNc después de 17, 20, 23 y 26 ciclos de amplificación (carril 1, 2, 3 y 4, respectivamente). El carril 5 corresponde al marcador de peso molecular “1kb plus ladder” (Promega).

Se obtuvieron amplicones específicos sin la formación de dímeros de oligonucleótidos a partir del ADNc sintetizado y utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados. Los tamaños de los amplicones son similares a los tamaños teóricos esperados; excepto el amplificado por el par de oligonucleótidos CMT3F y R, que resultó aparentemente mayor. Es importante mencionar que estos oligonucleótidos también generaron un amplicón inespecífico de menor tamaño (**Figura 8**). Las condiciones óptimas de amplificación establecidas para cada uno de los productos obtenidos se muestran en el **Cuadro 5**.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADNc codificando presuntivamente ADNMET's. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular "1kb plus ladder" (Promega). Los carriles 2, 3, 4, 5 y 7 corresponden a los fragmentos de ADNc tentativos DRM1, DRM2, MET1, MET1-2 y CMT3, respectivamente. El carril 6 corresponde a un producto inespecífico de la amplificación con los oligonucleótidos CMT3F y R.

**Cuadro 5.** Condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos de ADNc codificando presuntivamente ADNMET's. El volumen total de reacción fue de 25  $\mu$ L.

Par de Iniciadores	Cantidad de iniciadores	Temperatura de fusión	Cantidad de templado
D1F y R	12.5 pmoles	65.0°C	25 ng
D2F y R	12.5 pmoles	62.5°C	50 ng
M1F y R	6.25 pmoles	57.0°C	50 ng
M1-2F y R	12.5 pmoles	62.5°C	50 ng
C3F y R	6.25 pmoles	62.1°C	50 ng

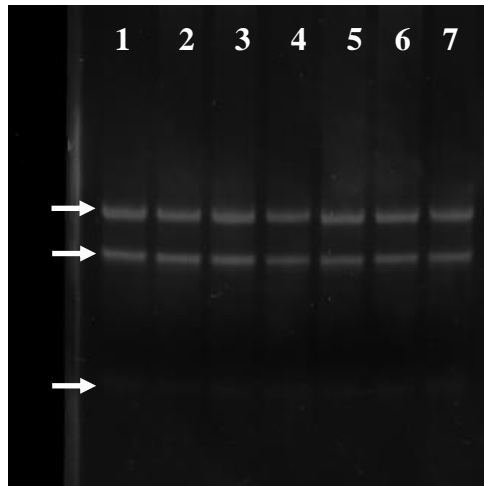
Resultado de la secuenciación se obtuvieron 5 secuencias de expresión etiquetadas de genes específicos (SETIS) cuya longitud fue similar al tamaño teórico esperado. Al realizar el análisis a nivel de aminoácidos se encontró que las secuencias mostraban similitud significativa con proteínas de las familias DRM, MET1 y CMT3 de otras especies de plantas (**Cuadro 6**).

**Cuadro 6.** Resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de los SETIS obtenidos. Los resultados se analizaron en base al algoritmo Blastx (Valor E < 1e-06) en la base de datos no redundante del NCBI.

SETI	Longitud (pb)	Proteína / Organismo	Valor E	Identidad	Cobertura
<b>DRM1</b>	535	ADN (citosina-5)-metiltransferasa DRM1/2 <i>Theobroma cacao</i>	4e-51	82%	56%
<b>DRM2</b>	354	ADN (citosina-5)-metiltransferasa DRM2 / <i>Glycine soja</i>	1e-46	70%	93%
<b>MET1</b>	495	ADN (citosina) metiltransferasa 1 tipo MET / <i>Malus domestica</i>	9e-79	90%	87%
<b>MET1-2</b>	408	ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 / <i>Morus notabilis</i>	8e-32	64%	93%
<b>CMT3</b>	589	ADN (citosina-5)-metiltransferasa CMT3 / <i>Medicago truncatula</i>	4e-70	76%	95%

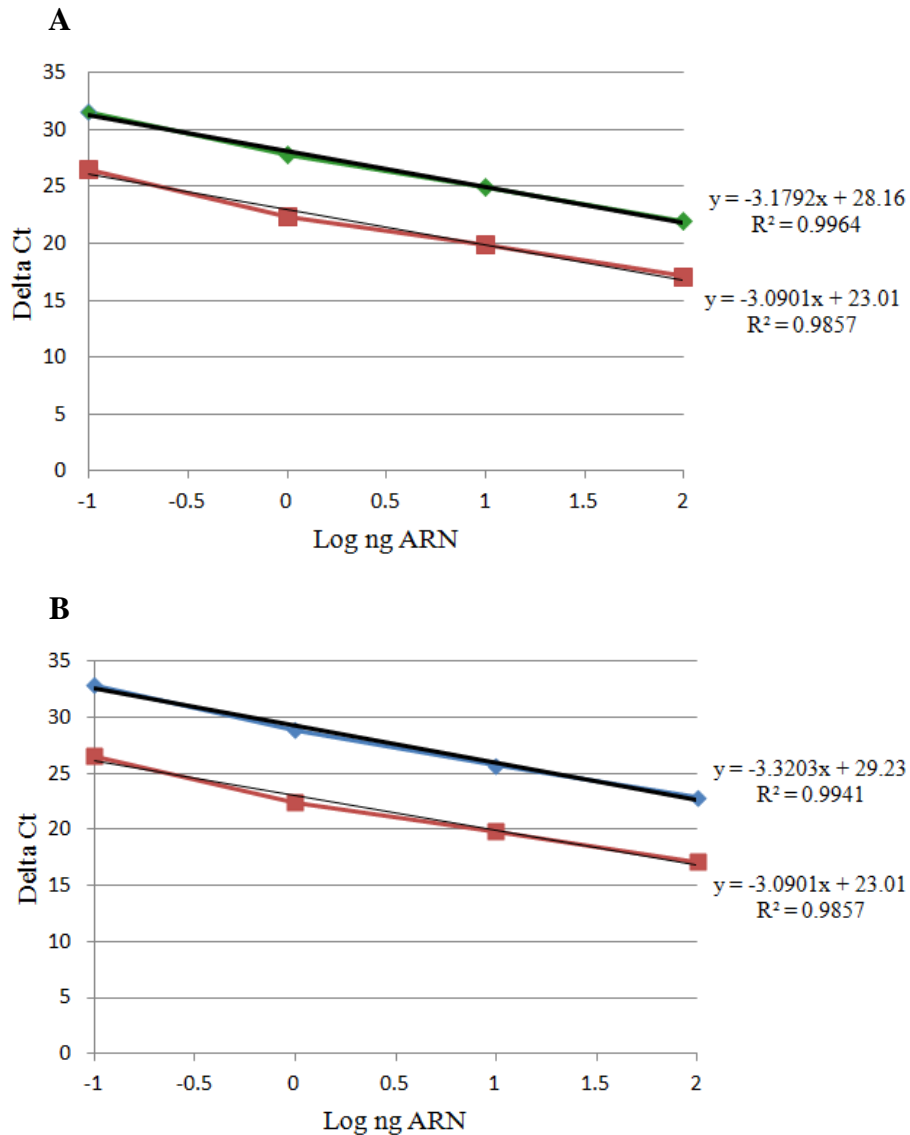
#### VI. IV. Efecto de la Vitrificación y Crioconservación sobre la Expresión de Transcritos Codificando ADNMET

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para qRT-PCR a partir de la secuencia nucleotídica de los SETIS *DRM1* y *MET1.2* obtenidos. Se logró extraer ARN total de embriones vitrificados con los tratamientos V5 y V7 y crioconservados durante media hora (Mh-V5 y Mh-V7) y dos horas (2h-V5 y 2hV7); así como ARN total de los testigos (T+), el cual se utilizó como calibrador en el análisis de expresión relativa. Las concentraciones de ARN obtenidas variaron de 53 a 104 ng/μL y la relación de absorbancia 260/280 de todos los tratamientos estuvo entre 1.93 y 2.13. En la **Figura 9** se observa el análisis electroforético en gel de agarosa con las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal. En base a lo anterior, se decidió que la cantidad, pureza e integridad del ARN era suficiente para poder realizar los estudios posteriores (Fleige y Pfaffl, 2006).



**Figura 9.** Análisis electroforético de ARN total de embriones cigóticos crioconservados por vitrificación. Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a ARN de los tratamientos T+, V5, V7, Mh-V5, Mh-V7, 2H-V5 y 2H-V7, respectivamente. Las flechas indican las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARNr y la más pequeña a la subunidad 5S del ARNt.

Se realizaron curvas de disociación para cada uno de los transcritos evaluados, las cuales indicaron la amplificación específica de cada uno de ellos, sin la formación de dímeros de iniciadores o productos inespecíficos. El análisis de validación por curva estándar indicó que los transcritos *DRM1* y *MET1-2* y el gen constitutivo *GAPDH* poseen eficiencias de amplificación similares, todas cercanas al 100% (**Figura 10**). En base a estos resultados, se decidió continuar con la evaluación de la expresión por el método  $\Delta\Delta C_t$  comparativo.



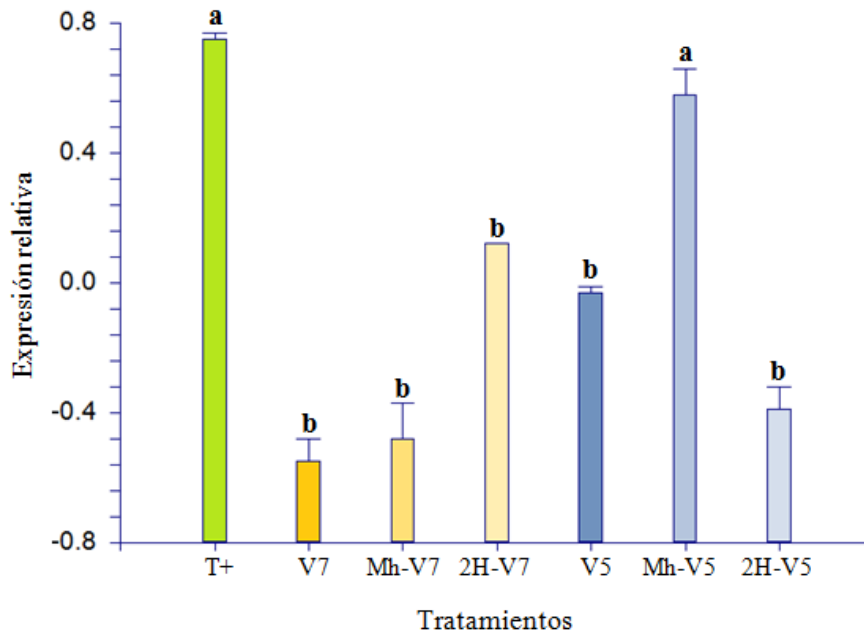
**Figura 10.** Validación del análisis de expresión relativa  $\Delta\Delta Ct$  por curva estándar. **A:** Análisis de la eficiencia de amplificación de *DRMI* (línea superior) respecto a *GAPDH* (línea inferior). **B:** Análisis de eficiencia de amplificación de *MET1* (línea superior) respecto a *GAPDH* (línea inferior). Las gráficas se construyeron mediante una regresión lineal de los valores de Ct calculados en la reacción de amplificación (eje de las y) contra los logaritmos de la concentración de ARN usados para la reacción (eje de las x). Se consideraron cuatro puntos experimentales con diluciones 1:10 de la concentración inicial de ARN.

Los resultados del análisis de expresión relativa muestran que el tratamiento de vitrificación V7 causó una disminución en la expresión ( $p < 0.05$ ) de *MET1-2*. No se observó diferencia en la expresión de *MET1-2* en embriones vitrificados con V7

respecto a los que fueron crioconservados durante media hora (Mh-V7) y dos horas (2H-V7); es decir, al parecer no hay efecto del tiempo de exposición a NL de media hora (Mh-V7) a dos horas (2H-V7) en la expresión de *MET1-2*. Lo anterior sugiere que la disminución en la expresión observada se debe al tratamiento con PVS2 y no al efecto de la crioconservación; no obstante, esto podría deberse a que a esta temperatura (-196°C) la actividad metabólica de los embriones es prácticamente nula y eso puede explicar que no se hayan observado cambios en la expresión del gen (Panis y Lambardi, 2006).

Para el caso del tratamiento V5, se encontró una disminución en la expresión de *MET1-2*, con respecto al control ( $p < 0.05$ ). No se encontró diferencia entre embriones vitrificados con V5 y crioconservados durante dos horas (2H-V5); mostrando ambos una disminución ( $p < 0.05$ ) en la expresión de *MET1-2*. De manera interesante, la crioconservación con V5 durante media hora (Mh-V5) no causó cambios ( $p > 0.05$ ) en la expresión de *MET1-2* con respecto al control. Esto contrasta con lo observado en el tratamiento V7 donde no se encontraron diferencias en la expresión entre los embriones vitrificados y crioconservados. Asimismo, estos resultados no soportan la explicación considerada para el tratamiento V7 acerca de que la crioconservación detiene completamente la actividad metabólica de los embriones por lo que no existen diferencias entre vitrificados y crioconservados (**Figura 11**).





**Figura 11.** Análisis de la expresión de genes *MET1-2* en embriones de *V. vinifera* criopreservados por vitrificación. **T+**: Embriones sin vitrificar y sin criopreservar. **V7**: Vitrificados 1 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 1 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V7**: Vitrificados con las condiciones V7 y sumergidos en NL 30 min. **2H-V7**: Vitrificados con las condiciones V7 y sumergidos 2 horas en NL. **V5**: Vitrificados 10 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 10 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V5**: Vitrificados con las condiciones V5 y sumergidos en NL 30 min. **2H-V5**: Vitrificados con las condiciones V5 y sumergidos 2 horas en NL. Las barras corresponden a la media de dos repeticiones ± el error estándar. Literales distintas sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El funcionamiento normal de un sistema biológico es el resultado de la activación o inhibición de la expresión de genes específicos; estos mecanismos son susceptibles a alteraciones por estrés (Pardue, 1991). Mediante el análisis de expresión realizado en el presente estudio se encontró que la criopreservación por vitrificación disminuye la expresión de *MET1-2*. Las MET1 son ADNMET de mantenimiento que metilan sitios hemimetilados del ADN, principalmente en sitios simétricos CG. La función de estas enzimas es mantener la metilación durante la división celular, por lo que la disminución de su actividad puede provocar una alteración en el patrón de metilación del ADN, lo cual a su vez puede inducir cambios fenotípicos (Grant-Downton y Dickinson, 2005).

Steward y colaboradores (2000) realizaron un estudio en el que observaron que transcritos codificando MET1 de maíz (*ZmMET1*) se acumulaban en células meristemáticas. Interesantemente, al exponer este tejido a deshidratación, salinidad o lesiones físicas, el nivel de los transcritos *ZmMET1* era menor. Los autores sostienen que la expresión de *ZmMET1* se ve afectada cuando factores abióticos alteran la división celular y replicación del ADN. Como se mencionó anteriormente, la criopreservación por vitrificación implica la exposición del tejido vegetal a estrés abiótico (Harding, 2004), pudiendo causar una deshidratación celular excesiva o el rompimiento de membranas celulares. La disminución en la expresión de *MET1-2* observada en embriones cigóticos puede deberse al estrés causado por los tratamientos de vitrificación y criopreservación aplicados.

Grant-Downton y Dickinson (2005) sostienen que la temperatura influye en la regulación de los mecanismos epigenéticos en un organismo y que la actividad de las ADNMET's podría mostrar sensibilidad a los cambios de temperatura. En relación a lo anterior, Peredo y colaboradores (2008) reportan eventos de demetilación del ADN ocasionados por la criopreservación en *Humulus lupulus* L. Lo anterior sugiere que la disminución del transcrito *MET1-2* observada en el presente estudio podría estar ocasionando una demetilación del ADN de los embriones en respuesta a la criopreservación.

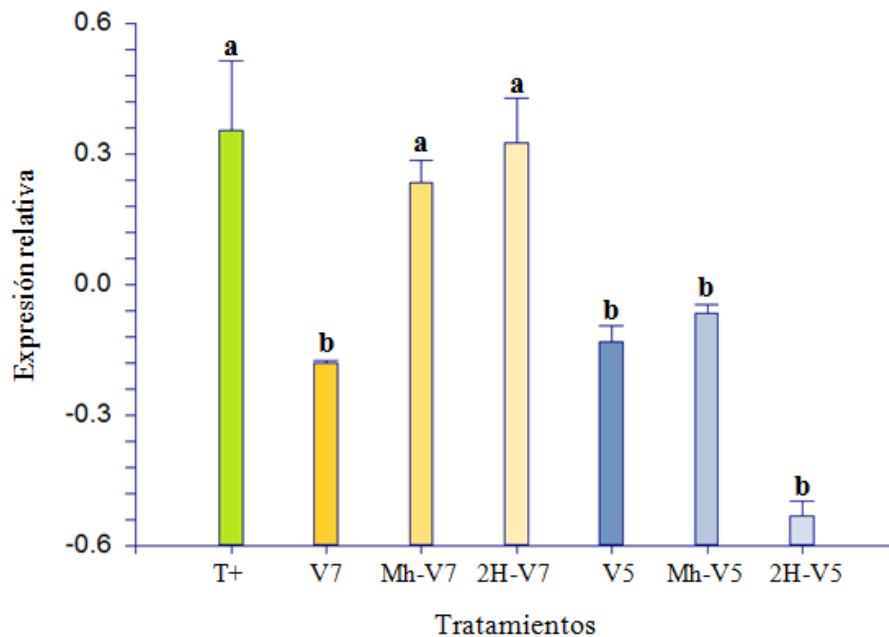
Steward y colaboradores (2000) encontraron una demetilación de transposones en raíz bajo estrés por frío, relacionada con una disminución en la acumulación de transcritos *ZmMET1*. La demetilación de transposones puede causar su activación, generando cambios genéticos en un organismo. De manera interesante, estos autores encontraron que el estrés por frío no generó una disminución de los transcritos *ZmMET1* en mesocotilos de maíz; y tampoco se observó demetilación significativa de transposones en estos tejidos. Los autores hipotetizan que MET1 puede estar participando en la prevención de la demetilación del ADN en condiciones de estrés; asimismo, sugieren que las diferencias en la capacidad de responder al estrés por frío entre raíces y

mesocotilos se debe a que en la naturaleza estos últimos están más expuestos a cambios severos de temperatura.

Los resultados del presente estudio muestran que la disminución en la expresión de *MET1-2* en embriones de *V. vinifera* ocurre en respuesta a tiempos de exposición cortos a la solución PVS2 (V7) y esta disminución continúa al aumentar el tiempo de vitrificación (V5). Lo anterior sugiere una respuesta epigenética rápida al estrés causado por la vitrificación y que los niveles de expresión de *MET1-2* no se restablecen incluso después de 20 min. de exposición a PVS2, como lo demuestra la expresión del gene en el tratamiento V5. Eso puede deberse a que el embrión está constantemente sometido a estrés y no le es posible recuperar su homeostasis. No obstante, para corroborar esta aseveración es necesario realizar más estudios, así como evaluar la expresión en tiempos intermedios y anteriores a los mencionados.

Como se mencionó anteriormente el tratamiento Mh-V7 disminuyó la expresión de *MET1-2*; sin embargo, este no fue el caso para Mh-V5. En base al análisis de desarrollo de embriones, se encontró que el tratamiento Mh-V5 protegió mas efectivamente al embrión del daño que ocasiona la congelación en nitrógeno líquido. En contraste, el tratamiento Mh-V7 no protegió a los embriones de forma tan efectiva como el tratamiento Mh-V5. Johnston y colaboradores (2009), al evaluar los cambios en la metilación de ADN por efecto de la crioconservación en meristemas apicales de distintas especies de *Ribes*, observaron una disminución en la metilación en genotipos sensibles a la crioconservación. Lo anterior sugiere que la disminución en la expresión de *MET1-2* observada en el tratamiento Mh-V7 podría estar causando una disminución en la metilación del ADN, lo cual podría estar relacionado con la sensibilidad de los embriones de uva a la crioconservación. Esto es, el estrés ocasionado por el tratamiento Mh-V7 podría estar causando una disminución en *MET1-2*; mientras que el tratamiento Mh-V5, al brindar crioprotección, no lo hace. Sin embargo, es necesario evaluar la expresión de *MET1-2* en embriones crioconservados sin tratamiento con la solución PVS2 para soportar estos hallazgos.

En plantas, no existen estudios en los que se haya evaluado la expresión de genes codificando las ADNMET's *de novo* de la familia DRM en respuesta a estrés abiótico. En el presente estudio se observó que los dos tratamientos de vitrificación evaluados (V5 y V7) disminuyeron la expresión de *DRM1* ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en la expresión de *DRM1* en embriones vitrificados con V5 respecto a los que fueron crioconservados durante media hora (Mh-V5) y dos horas (2H-V5), resultando ambos con una disminución en su expresión ( $p < 0.05$ ). Interesantemente, la vitrificación con V7 redujo la expresión de *DRM1* ( $p < 0.05$ ), pero no se observó disminución ( $p > 0.05$ ) en la expresión de este gen por efecto de la crioconservación durante media hora (Mh-V7) y dos horas (2H-V7) (**Figura 12**).



**Figura 12:** Análisis de la expresión de genes *DRM1* en embriones de *V. vinifera* crioconservados por vitrificación. **T+:** Embriones sin vitrificar y sin crioconservar. **V7:** Vitrificados 1 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 1 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V7:** Vitrificados con las condiciones V7 y sumergidos en NL 30 min. **2H-V7:** Vitrificados con las condiciones V7 y sumergidos 2 horas en NL. **V5:** Vitrificados 10 min. en PVS2 (50%) a 25°C y 10 min. en PVS2 (100%) a 0°C. **Mh-V5:** Vitrificados con las condiciones V5 y sumergidos en NL 30 min. **2H-V5:** Vitrificados con las condiciones V5 y sumergidos 2 horas en NL. Las barras corresponden a la media de dos mediciones  $\pm$  el error estándar. Literales distintas indican diferencias significativas.

Las DRM son ADNMET's encargadas de establecer un patrón de metilación nuevo y en condiciones de desarrollo normal, establecen las diferencias en la metilación durante la división celular que dan origen a la diferenciación celular y el desarrollo de un organismo. La pérdida o disminución de su actividad podría impedir el establecimiento de un patrón de metilación dado (Cao y Jacobsen, 2002); contrariamente, el aumento de su actividad podría significar la hiper-metilación en el ADN en respuesta a un estímulo ambiental. La disminución en la expresión de *DRM1* observada en el presente estudio, se pudo deber a una disminución en los eventos de diferenciación celular y desarrollo embrionario causada por el efecto dañino de la vitrificación y crioconservación.

Las DRM realizan su actividad metiltransferasa *de novo* en conjunto con pequeños ARNs de interferencia, participando en mecanismos de silenciamiento transcripcional en plantas, en el proceso denominado "metilación de ADN dependiente de ARN" (RdDM, por sus siglas en inglés) (Wassenegger et al., 1994). Los resultados del presente estudio sugieren una desregulación de estos procesos por efecto de la crioconservación por vitrificación. Ambos tratamientos de vitrificación (V5 y V7) disminuyeron la expresión de *DRM1* y *MET1-2*; sin embargo, la crioconservación durante media hora únicamente disminuyó la expresión de *DRM1* para embriones vitrificados con V5 (Mh-V5). Contrariamente, en embriones vitrificados con V7 y crioconservados durante media hora (Mh-V7) únicamente se observó la disminución de *MET1-2*. Otros estudios demuestran que MET1 participa en conjunto con DRM en este tipo de regulaciones; no obstante, MET1 puede participar en procesos de metilación de ADN independientes de RdDM (Grant-Downton y Dickinson, 2005). La crioconservación en embriones de *V. vinifera* parece afectar la metilación de ADN mediante la desregulación de más de un proceso bioquímico; la desregulación de un proceso u otro parece depender del grado de crioprotección brindado.

Zeng y colaboradores (2014), al evaluar los cambios en la expresión de genes que participan en mecanismos de regulación epigenética en espermatozoides de jabalí, encontraron una disminución de los genes codificando para ADNMET de mantenimiento *Dnmt3a* y *de novo Dnmt3b* por efecto de la crioconservación y

vitrificación. De manera interesante, el tratamiento previo con glicerol (3%) no indujo cambios en la expresión del gen *Dnmt3b* en espermatozoides criopreservados; sin embargo, la expresión de *Dnmt3a* sin crioprotección fue mayor que en embriones tratados con glicerol (3%).

Zhao y colaboradores (2013) evaluaron los cambios en la metilación de sitios CG del promotor y niveles de expresión de los genes *Dnmt1o*, *Hat1*, y *Hdac1*, codificando para una ADNMET de mantenimiento, histona acetiltransferasa e histona deacetilasa, respectivamente, en ovocitos de ratón vitrificados. En este estudio, no se observaron cambios en la metilación del promotor para ninguno de los genes evaluados; ni en la expresión de los genes *Hat1* y *Hdac1* por efecto de la vitrificación. Sin embargo, se observó que la vitrificación disminuyó la expresión del gene *Dnmt1o*, lo cual es similar a lo encontrado en el presente trabajo en el tratamiento V7. Las ADNMET's de mantenimiento podrían ser las enzimas que más se ven afectadas por el tratamiento de criopreservación, respecto a otras enzimas que realizan modificaciones epigenéticas. Los resultados reportados por Zhao y colaboradores (2013) sugieren que la desmetilación por disminución de MET1 afecta la regulación en la expresión de genes que participan en varios fenómenos fisiológicos y no necesariamente en el fenómeno de epigenética.

Wada y colaboradores (2004) al estudiar tabaco transgénico expresando una MET1 antisentido (*NtMET1*) lograron identificar el aumento en la transcripción de 31 genes. Dieciséis de los genes identificados codificaban para proteínas con funciones conocidas, la mayoría relacionadas con la respuesta al estrés. Al infectar hojas de tabaco silvestres con el virus del mosaico del tabaco observaron un aumento en la expresión y cambios en la metilación de *NtAlix1*, un gen relacionado con la defensa contra patógenos. Los resultados de este estudio sugieren la posible relación entre la expresión de genes *MET1*, los cambios en la metilación del ADN y la respuesta a distintos tipos de estrés.

En la actualidad, los reportes de la literatura señalan que la expresión de genes y la metilación de ADN cambian dinámicamente en respuesta a factores ambientales de

estrés; y que dichos cambios, son modulados en parte por ADNMET's (Steward et al., 2000). Existe una respuesta epigenética de los tejidos biológicos al efecto de la crioconservación por vitrificación; sin embargo, el conocimiento generado en la actualidad no es del todo concluyente; de manera general se observa una disminución en la metilación y en la expresión de genes *MET1* en tejidos biológicos sensibles a la crioconservación. La respuesta epigenética a estos factores parece depender del organismo y tejido que se esté evaluando. Por otra parte, la tolerancia a la vitrificación y crioconservación, también parecen ser específicos de especie y tejido analizado. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo genético que se activa en un organismo para que pueda sobrevivir a los efectos de la crioconservación por vitrificación. Un estudio de microarreglos de ADNc demostró que es posible detectar la activación e inactivación de genes específicos en meristemos apicales de *Arabidopsis* que sobrevivieron a la crioconservación (Volk, 2010).

Boonkusol y colaboradores (2006) reportan que la crioconservación por vitrificación en embriones de ratón (*Mus musculus*) causa la sobre-expresión de seis genes relacionados con estrés y que la expresión de dichos genes disminuye a las 10 horas después de la descongelación. Los autores sugieren que los genes sobre-expresados pueden estar relacionados con la reducción en la viabilidad de los embriones por efecto de la vitrificación. En un estudio similar, mediante un análisis con microarreglos y qRT-PCR se identificaron 183 genes diferencialmente expresados por efecto de la crioconservación por vitrificación en embriones de ratón. Del total de genes evaluados 107 estuvieron sobre-expresados; la mayoría relacionados con respuesta al estrés. Los autores sostienen que este estudio permitió la identificación de posibles genes responsables de la supervivencia a la crioconservación (Mamo et al., 2006)

En el presente estudio, se observó que los embriones cigóticos crioconservados requieren mas tiempo para iniciar el programa de desarrollo y para lograr un desarrollo completo (Datos no mostrados). Kartha (1985) menciona que esto se puede deber al tiempo requerido para la reparación del daño celular y a que el número de células sobrevivientes se reduce, por lo que se necesita más tiempo para la reproducción y el

desarrollo hasta alcanzar un crecimiento observable. Varios estudios han encontrado que la criopreservación y la exposición a genotóxicos causa la activación de mecanismos de reparación del ADN en hepatocitos; consecuentemente, se observa una disminución en la síntesis de ARN y proteínas en los primeros días post-descongelación, volviendo a los valores normales en los días siguientes (Fuller, 2003).

Experimentos en plantas indican que la reparación del daño post-descongelamiento se realiza principalmente en la membrana celular y que durante esta reparación se detiene el ciclo celular (Kantha, 1985). Lo anterior indica que la disminución en la expresión de *MET1-2* y *DRM1* observada en el presente estudio, podría deberse a una disminución de la división y diferenciación celular por respuesta al daño causado por la criopreservación por vitrificación. No obstante, se requieren datos adicionales además de la expresión de los genes *ADNMET* para poder comprender las alteraciones en el epigenoma causadas por distintos tipos de estrés (Iwatani et al., 2006).



## VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se observó que el aumento en el tiempo de inmersión en la solución PVS2 y en nitrógeno líquido reduce la viabilidad de los embriones evaluada mediante reducción de TTC. No obstante, fue posible establecer un protocolo de vitrificación mediante el cual se indujo el desarrollo en el 30% de los embriones tratados después de una inmersión en nitrógeno líquido durante 30 minutos. Asimismo, se lograron obtener dos secuencias de expresión etiquetadas que codifican las enzimas de la familia 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados (DRM), dos que codifican la 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1 (MET1) y una de la familia de 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina (CMT).

Mediante el análisis de expresión relativa se observó que los tratamientos de crioconservación y vitrificación evaluados alteran la expresión de los genes que codifican las enzimas MET1 y DRM. Se concluye que los genes analizados son parte del mecanismo de regulación epigenética en embriones de uva y que posiblemente los tratamientos de vitrificación y crioconservación alteran el nivel de metilación del ADN en embriones cigóticos de uva. Se sugiere que la disminución en la capacidad de desarrollo del embrión ocasionada por el tratamiento de vitrificación-crioconservación, se debe en parte, a alteraciones en el nivel de metilación del ADN y consecuentemente cambios en la regulación de la expresión de genes.

## **VIII. PERSPECTIVAS**

Es necesario realizar estudios que evalúen los cambios en el transcriptoma y en el patrón de metilación del genoma en embriones cigóticos en respuesta a la crioconservación por vitrificación para elucidar los mecanismos mediante los cuales el tejido vegetal resulta susceptible o resistente a dichos tratamientos. Se sugiere que las evidencias experimentales que se generen apoyarán en el desarrollo de protocolos que permitan la crioconservación de especies vegetales sin sufrir cambios por periodos ilimitados de tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA

Achrem M., Skuza L., Kalinka A., Szućko I., Filip E., Słominska-Walkowiak R. y Rogalska S.M. 2012. Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botanica*. 54: 7–15.

Aksu D.A., Agca C., Aksu S., Bagis H., Akkoc T., Caputcu A.T., Arat S., Taskin A.C., Kizil S.H. y Karasahin T. 2012. Gene expression profiles of vitrified *in vitro* and *in vivo* derived bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*. 79(9): 613-625.

Almanza P.J., Serrano P.A., Fischer G. y Balaguera-López H.E. 2010. Rompimiento de la dormancia de yemas de uva (*Vitis vinifera* L.) mediante aplicaciones de extracto de ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones del trópico alto. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 4(2): 143-152.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-3402.

Antony J.J.J., Poobathy R., Danial M., Sinniah U.R. y Subramaniam S. 2012. Polymorphism analysis of cryopreserved *Dendrobium* Bobby Messina protocorm-like bodies (PLBs) using RAPD markers. *Plant Omics Journal*. 5(5):427-431.

Bacchetta G., Fenu G., Mattana E., Bueno-Sanchez A., Jiménez-Alfaro B., Piotto B. y Virevaire M. 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias. La Caixa, España. 378 pp.

Barth S., Forneck A., Verzeletti F., Blaich R. y Schumann F. 2009. Genotypes and phenotypes of an *ex situ* *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Beger germplasm collection from the Upper Rhine Valley. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56(8): 1171-1181

Basli A., Soulet S., Chaher N., Mérillon J.-M., Chibane M., Monti J.-P. y Richard T. 2012. Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1(1): 1-4.

Bernacchia G., Primo A., Giorgetti L., Pitto L. y Cella R. 1998. Carrot DNA methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *The Plant Journal*. 13(3): 317-329.

Boonkusol D., Gal A.B., Bodo S., Gorhony B., Kitiyanant Y. y Dinnyes A. 2006. Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 73(6): 700-708.

Cao X. y Jacobsen S.E. 2002. Role of the *Arabidopsis* DRM Methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*. 12(13): 1138-1144.

Cokus S.J., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., Haudenschild C.D., Pradhan S., Nelson S.F., Pellegrini M. y Jacobsen S.E. 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*. 452(7184): 215-219.

Cornejo M.-J., Wong V.L. y Blechl A.E. 1995. Cryopreserved callus: a source of protoplasts for rice transformation. *Plant Cell Reports*. 14(4): 210-214.

Channuntapipat C., Sedgley M. y 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(6): 890-897.

Dai Y., Ni Z., Dai J., Zhao T. y Sun Q. 2005. Isolation and expression analysis of genes encoding DNA methyltransferase in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1729(2): 118-125.

Dangl G.S., Mendum M.L., Prins B.H., Walker M.A., Meredith C.P. y Simon C.J. 2001. Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: a tool for managing a grape germplasm collection. *Genome*. 44(3): 432-438.

De Souza R., C, de Castro O., da Silva C. R. y Panobianco M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolium test1. *Revista Brasileira de Sementes*. 34(1): 047-054.

De Storme N. y Mason A. 2014. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*. 1: 10-33.

Dieffenbach C.W., Lowe T.M. y Dveksler G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*. 3(3): S30-S37.

Dunoyer P., Lecellier C.-H., Parizotto E.A., Himber C. y Voinnet O. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell Online*. 16(5): 1235-1250.

Engelmann F. 1991. *in vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica*. 57(3): 227-243.

Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 47(1): 5-16.

Engelmann F. y Engels J. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. *Managing Plant Genetic Diversity*. pp. 89-103.

Farrant J. y Woolgar A. 1972. Human red cells under hypertonic conditions; A model system for investigating freezing damage: 2. Sucrose. *Cryobiology*. 9(1): 9-15.

Finkle B.J. y Ulrich J.M. 1979. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiology*. 63(4): 598-604.

Fleige S. y Pfaffl M.W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2): 126-139.

Fuller B.J. 2003. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. *CryoLetters*. 24(2): 95-102.

Ganino T., Silvanini A., Beghé D., Benelli C., Lambardi M. y Fabbri A. 2012. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum*. 56(1): 78-82.

Gass T., Tobutt K. y Zanetto A. 1996. Report of the Working Group on *Prunus*. Fifth meeting. International Plant Genetic Resources Institute. Roma, Italia. 1-70.

Giannino D., Mele G., Cozza R., Bruno L., Testone G., Ticconi C., Frugis G., Bitonti M.B., Innocenti A.M. y Mariotti D. 2003. Isolation and characterization of a maintenance DNA methyltransferase gene from peach (*Prunus persica* [L.] Batsch):

transcript localization in vegetative and reproductive meristems of triple buds. *Journal of Experimental Botany*. 54(393): 2623-2633.

Grant-Downton R. y Dickinson H. 2005. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*. 96(7): 1143-1164.

Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters*. 25(1): 3-22.

Harding K., Marzalina M., Krishnapillay B., Zaimah N.N., Normah M. y Benson E. 2000. Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine the chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes. *Journal of Tropical Forest Science*. 149-163.

Hassan N.A. y Haggag A.M. 2013. Cryopreservation of two egyptian grape (*Vitis vinifera*) cultivars using two steps vitrification protocol. *World Applied Sciences Journal*. 28(2): 254-258.

Hervas J. y Gimenez-Martin G. 1973. Dimethyl sulphoxide effect on division cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 29(12): 1540-1542.

Horn P.J. y Peterson C.L. 2002. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*. 297(5588): 1824-1827.

Huang Y.-L., Chu H.-F., Dai F.-J., Yu T.-Y. y Chau C.-F. 2012. Intestinal health benefits of the water-soluble carbohydrate concentrate of wild grape (*Vitis thunbergii*) in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(19): 4854-4858.

Imazio S., Grassi F., De Mattia F., Labra M., Scienza A. y Failla O. 2007. Biodiversity and conservation of *Vitis vinifera* spp *sylvestris*. *Acta Horticulturae*. 827: 01-10.

Ishikawa K., Harata K., Mii M., Sakai A., Yoshimatsu K. y Shimomura K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 16(11): 754-757.

Iwatani M., Ikegami K., Kremenska Y., Hattori N., Tanaka S., Yagi S. y Shiota K. 2006. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*. 24(11): 2549-2556.

Johnston J.W., Benson E.E. y Harding K. 2009. Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47(2): 123-131.

Kaity A., Ashmore S. y Drew R.A. 2009. Field performance evaluation and genetic integrity assessment of cryopreserved papaya clones. *Plant Cell Reports*. 28(9): 1421-1430.

Kaity A., Ashmore S., Drew R.A. y Dulloo M. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports*. 27(9): 1529-1539.

Kartha K.K. 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC press Inc. Segunda Ed. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos. 276 pp.

Kubaláková M., Doležel J. y Lebeda A. 1996. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. *Biologia Plantarum*. 38(3): 475-480.

Lacombe T., Audeguin L., Boselli M., Bucchetti B., Cabello F., Chatelet P., Crespan M., D'Onofrio C., Eiras Dias J. y Ercisli S. 2011. Grapevine European Catalogue: towards a comprehensive list. *Vitis*. 50(2): 65-68.

Landsmann J. y Uhrig H. 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theoretical and Applied Genetics*. 71(3): 500-505.

Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A. y Lopez R. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(1): 2947-2948.

Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.-P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P. y Roux C. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*. 122(6): 1233-1245.

Lazo-Javalera M.F., Tiznado-Hernández M.E., Vargas-Arispuro I., Valenzuela-Soto E., Rocha-Granados M.d.C., Martínez-Montero M.E. y Rivera-Domínguez M. 2014. Changes in lipid peroxidation, total protein and antioxidant enzyme activity in buds of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. 'Flame Seedless' in response to cryopreservation by vitrification. *Electronic Journal of Biotechnology*.

Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P., Zilberman D., McCallum C.M., Henikoff S. y Jacobsen S.E. 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*. 292(5524): 2077-2080.

Maldonado-Navarro L.A., Vieira F. F. y Martínez-Díaz G. 2011. Seminario de Viticultura 2011. Sonora, México. 95 pp.

Malik G., Dangwal M., Kapoor S. y Kapoor M. 2012. Role of DNA methylation in growth and differentiation in *Physcomitrella patens* and characterization of cytosine DNA methyltransferases. *FEBS Journal*. 279(21): 4081-4094.

Mamo S., Bodo S., Kobolak J., Polgar Z., Tolgyesi G. y Dinnyes A. 2006. Gene expression profiles of vitrified *in vivo* derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Molecular Reproduction and Development*. 73(11): 1380-1392.

Marco-Medina A. y Serrano-Martínez F. 2012. Criopreservación: herramienta para la conservación *ex situ* de material vegetal. *Cuadernos de Biodiversidad*. 38(1): 9-12.

Marković Z., Chatelet P., Sylvestre I., Kontić J.K. y Engelmann F. 2013. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. *Central European Journal of Biology*. 8(10): 993-1000.

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(3): 299-304.

Miguel C. y Marum L. 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*. 62(11): 3713-3725.

Mikuła A., Tomiczak K. y Rybczyński J.J. 2011. Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi) genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Reports*. 30(4): 565-574.

Mora O.F., Castillo J.G.C., Sánchez A.A.C. y Landero A.d.C.R. 2008. Localización y usos de vides silvestres (*Vitis* spp.) en el estado de Puebla, México. *Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo sostenible*. 4(1): 151-166.

Owen-Hughes T. 2003. Pathways for remodelling chromatin. *Biochemical Society Transactions*. 31(5): 893-906.



Panis B. y Lambardi M. 2006. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *In: The Role of Biotechnology in Exploring And Protecting Agricultural Genetic Resources* (eds. Ruane J. and A. Sonnino). FAO. Roma, Italia. pp: 61-78.

Panis B., Piette B. y Swennen R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*. 168(1): 45-55.

Pardue M.L. 1991. Dynamic instability of chromosomes and genomes. *Cell*. 66(3): 427-431.

Parker J.S., Roe S.M. y Barford D. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *The EMBO journal*. 23(24): 4727-4737.

Peredo E.L., Arroyo-García R., Reed B.M. y Revilla M. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology*. 57(3): 234-241.

Peschke V. y Phillips R. 1991. Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*. 81(1): 90-97.

Phillips R.L., Kaeppler S.M. y Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(12): 5222-5226.

Prymakowska-Bosak M., Przewłoka M.R., Ślusarczyk J., Kuraś M., Lichota J., Kiliańczyk B. y Jerzmanowski A. 1999. Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *The Plant Cell Online*. 11(12): 2317-2329.

Rao N., K., Hanson J., Dulloo M.E. y Ghosh K. 2007. *Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma*. Roma, Italia. 166 pp.

Rapp A., R y Wendel J.F. 2005. Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist*. 168(1): 81-91.

Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F. y Lund S.T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*. 6(1): 27.

Rival A., Jaligot E., Beulé T. y Finnegan E.J. 2008. Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, and DRM methyltransferases in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation to the 'mantled' somaclonal variation. *Journal of Experimental Botany*. 59(12): 3271-3281.

Sakai A., Engelmann F. y Takagi. H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. In: *Development of cryopreservation techniques*. Tsukuba, Japón. 1-7.

Sambrook J. y Russell D.W. 2006. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: maxipreparation. *Cold Spring Harbor Protocols*. 1(1): 38-41.

Sánchez C., Martínez M.T., Vidal N., San-José M.C., Valladares S. y Vieitez A.M. 2008. Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and rapid analysis of genetic stability. *CryoLetters*. 29(6): 493-504.

Santana J., Hidalgo E., De Lucas A., Recio P., Ortiz J., Martín J., Yuste J., Arranz C. y Rubio J. 2008. Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR-marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55(4): 573-583.

Saze H., Tsugane K., Kanno T. y Nishimura T. 2012. DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology*. 53(5): 766-784.

Sen-Rong H. y Ming-Hua Y. 2009. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 99(2): 217-226.

Shatnawi M., Anfoka G., Shibli R., Al-Mazra'awi M., Shahrour W. y Arebiat A. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turk J Agric For*. 35: 173-184.

Solís M.-T., Rodríguez-Serrano M., Meijón M., Cañal M.-J., Cifuentes A., Risueño M.C. y Testillano P.S. 2012. DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 63(18): 6431-6444.

Steponkus P.L. y Lanphear F. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology*. 42(10): 1423-1426.

Steward N., Kusano T. y Sano H. 2000. Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research*. 28(17): 3250-3259.

Sutherland G.R. y Richards R.I. 1994. Dynamic mutations. *American Scientist*. 157-163.

Teerawanichpan P., Chandrasekharan M.B., Jiang Y., Narangajavana J. y Hall T.C. 2004. Characterization of two rice DNA methyltransferase genes and RNAi-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus. *Planta*. 218(3): 337-349.

Tomé-Carneiro J., González M., Larrosa M., Yáñez-Gascón M.J., García-Almagro F.J., Ruiz-Ros J.A., García-Conesa M.T., Tomás-Barberán F.A. y Espín J.C. 2012. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 110(3): 356-363.

Ulrich J.M., Finkle B.J., Moore P.H. y Ginoza H. 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology*. 16(6): 550-556.

Vanyushin B. 2005. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Moscow)*. 70(5): 488-499.

Vázquez-Villanueva N. 2011. Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa, modelo de la agricultura moderna en México en el siglo XXI. Ed. Leticia Deschamps Solórzano. Sonora, México. 92 pp.

Verleysen H., Samyn G., Van Bockstaele E. y Debergh P. 2004. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77(1): 11-21.

Volk G.M. 2010. Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation. *Current Genomics*. 11(1): 24-29.

Wada Y., Miyamoto K., Kusano T. y Sano H. 2004. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*. 271(6): 658-666.

Wang Q., Mawassi M., Sahar N., Li P., Violeta C.-T., Gafny R., Sela I., Tanne E. y Perl A. 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation–vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77(3): 267-275.

Wang Z. y He Y. 2009. Effect of cryopreservation on the development and DNA methylation patterns of *Arabidopsis thaliana*. *Life Science Journal*. 6(1): 55-60.

Wang R.R., Gao X.X., Chen L., Huo L.Q., Li M.F. y Wang Q.C. 2014a. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*. 176: 330–339.

Wang B., Li J.W., Zhang Z.B., Wang R.R., Ma Y.L., Blystad D.R., Keller E.R.J. y Wang Q.C. 2014b. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. *Journal of Biotechnology*. 184: 47–55.

Wassenegger M., Heimes S., Riedel L. y Sanger H.L. 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*. 76(3): 567-576.

Winarto B., Mattjik N.A., Teixeira da Silva J.A., Purwito A. y Marwoto B. 2010. Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex Andre) regenerants derived from anther culture. *Scientia Horticulturae*. 127(1): 86-90.

Witt C. S. 1985. *Biotechnology and genetic diversity*. California, Estados Unidos. 146 pp.

Zemach A. y Grafi G. 2003. Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl CpG binding domain (MBD) proteins. *The Plant Journal*. 34(5): 565-572.

Zeng C., Peng W., Ding L., He L., Zhang Y., Fang D. y Tang K. 2014. A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*. 69(1): 119-127.

Zhai Z., Wu Y., Engelmann F., Chen R. y Zhao Y. 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *CryoLetters*. 24(5): 315-322.

Zhang M., Kimatu J.N., Xu K. y Liu B. 2010. DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics*. 37(1): 1-12.

Zhao X.-M., Ren J.-J., Du W.-H., Hao H.-S., Wang D., Qin T., Liu Y. y Zhu H.-B. 2013. Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 $\alpha$ , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertility and Sterility*. 100(1): 256-261.