

Efecto de los crioprotectores en la morfología y pérdida iónica en yemas axilares de vid cv. 'Flame Seedless' crioconservadas

Effect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. 'Flame Seedless'

María Fernanda Lazo-Javalera*, Karen Rosalinda Astorga-Cienfuegos*, Martín Ernesto Tiznado-Hernández*, Irasema Vargas-Arispuro*, Miguel Ángel Martínez-Téllez*, María Auxiliadora Islas-Osuna*, Miguel Ángel Hernández-Oñate*, Marcos Edel Martínez-Montero**, Marisela Rivera-Domínguez*✉

Lazo-Javalera, M. F., Astorga-Cienfuegos, K. R., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. Á., Islas-Osuna, M. A., ..., Rivera-Domínguez, M. (2017). Efecto de los crioprotectores en la morfología y pérdida iónica en yemas axilares de vid cv. 'Flame Seedless' crioconservadas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 25(72), 36-44.

RESUMEN

La crioconservación ha revolucionado el campo de la biotecnología. Congelar en nitrógeno líquido (NL) preserva células por largo tiempo. En ese sentido, en este trabajo se evaluaron tres condiciones de crioconservación basados en la vitrificación de yemas de vid. Las yemas fueron sometidas a PVS2, PVS3 y glicerol por 0-420 min, y colocadas en NL por una hora. De modo posterior a cada tiempo de incubación se cuantificó la pérdida de iones como medida de viabilidad y se evaluó el daño mediante observación en estereoscopio. Basados en el porcentaje de viabilidad el mejor método fue empleando PVS3 (30% viabilidad), seguido de glicerol (25%) y PVS2 (<10%). Las imágenes de las yemas expuestas a PVS3 no muestran daño en el tejido, a diferencia de PVS2 y glicerol, los cuales resultaron insuficientes para preservar el tejido. Estos resultados

Palabras clave: *Vitis vinifera* L.; PVS2; PVS3; glicerol; viabilidad; vitrificación.

Keywords: *Vitis vinifera* L.; PVS2; PVS3; glycerol; viability; vitrification.

Recibido: 12 de enero de 2017, aceptado: 18 de agosto de 2017

* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a La Victoria km 0.6, C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Correo electrónico: mafer_309@hotmail.com; kastorga@ciad.mx; tiznado@ciad.mx; iris@ciad.mx; norawa@ciad.mx; islasosu@ciad.mx; miguel.hernandez@ciad.mx; marisela@ciad.mx

** Plant Breeding Laboratory, Bioplants Center, University of Ciego de Avila. Carretera a Moron km 9, C. P. 69450, Ciego de Avila, Cuba. Correo electrónico: cubaplantas@gmail.com

✉ Autor para correspondencia

sugieren que el protocolo utilizando PVS3 puede ser considerado para la preservación de yemas de vid.

ABSTRACT

The cryopreservation has revolutionized the field of biotechnology. Frozen in liquid nitrogen (LN) preserves long living cells. In this sense, in this paper were evaluated three conditions of cryopreservation based on vitrification of buds of grapevine. The buds were subjected to the PVS2, PVS3 and glycerol for 0-420 min, and submerged in LN for one hour. After the incubation time electrolyte leakage was determined as a viability measurement, and tissue damage was evaluated through stereoscopic observation. Based on the viability percentage the best preservation method was using PVS3 solution (30%) followed by glycerol (25%) and PVS2 (<10%). The images of the buds exposed to PVS3 shows no tissue damage unlike to PVS2 and glycerol, were not sufficient to preserve buds tissue. The results shown here suggest that using PVS3 as protocol can be considered for buds grapevine germplasm preservation.

INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es considerada uno de los cultivos económicamente hablando más importantes en el mundo (Liu et al., 2012). Dicho cultivo se encuentra en constante peligro debido a factores bióticos y abióticos, por lo que es necesario conservar variedades de importancia agronómica y prevenir la pérdida del material genético. La

crioconservación es una alternativa muy eficiente para la subsistencia a largo plazo del material vegetal, basado en la reducción de las funciones metabólicas a la temperatura del NL (-196°C) (Engelmann, 2012, p. 255).

La técnica de crioconservación involucra el uso de crioprotectores, vitrificación, deshidratación, encapsulación, microgoteo y microplacas (Kavianí, 2011; Pathirana, McLachlan, Hedderley, Panis, & Carimi, 2016); los cuales tienen el objetivo de proteger y evitar daño letal en las membranas celulares, y eliminar así el efecto negativo sobre la viabilidad posterior a la crioconservación. Existen crioprotectores de bajo peso molecular y permeables como el etilenglicol, propilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y otros alcoholes; los de bajo peso molecular y no permeables como glucosa, sacarosa, trehalosa y prolina; los de alto peso molecular y no permeables como la polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, hialuronidato de sodio y otros polímeros (Benson, 2008, p. 15), que tienen la propiedad de incrementar la osmolaridad celular, la viscosidad y deshidratar, disminuyendo el punto de congelación e inducir la vitrificación (Benson, 2008); todo esto con la finalidad de evitar el daño por formación de cristales de hielo durante la congelación (Bhattacharya & Prajapati, 2016). Muchas técnicas de crioconservación incluyen un paso inicial para reducir el contenido de agua en los tejidos (deshidratación) e incrementar la viscosidad interna del citoplasma (mediante los crioprotectores), un segundo paso es el congelamiento rápido en nitrógeno líquido y el tercero involucra el descongelamiento rápido (Teixeira, González-Benito, & Molina-García, 2013).

La vitrificación es el método más utilizado en los tejidos vegetales, empleando soluciones crioprotectoras (mezcla de diferentes crioprotectores) altamente concentradas que tienen la función de mantener el estado vítreo en el citoplasma y evitan la formación de hielo intra y extracelular (González-Arno, Panta, Roca, Escobar, & Engelmann, 2008; Sakai & Engelmann, 2007). En vid se han implementado algunas de estas técnicas en diferentes tipos de tejidos (Ganino et al., 2012; Vasanth & Vivier, 2011). Se ha reportado la encapsulación-deshidratación en suspensiones celulares (Ben-Amar, Daldoul, Allel, Reustle, & Mliki, 2013; González-Benito, Martín, & Vidal, 2009) y en meristemos apicales (Bayati, Shams-Bakhsh, & Moini, 2011; Marković, Chatelet, Sylvestre, Kontić, & Engelmann, 2013). El protocolo de vitrificación mediante la solución PVS2 se ha aplicado sa-

tisfactoriamente. Matsumoto y Sakai (2003) crioconservaron brotes axilares de "Cabernet Sauvignon" utilizando PVS2 obteniendo 60-80% de recuperación. Zhai, Wu, Engelmann, Chen y Zhao (2003) crioconservaron "Cabernet franc", "Chardonnay", "Fengh 51" y "LN33" y reportaron en promedio 36% de regeneración.

Por otro lado, durante el congelamiento y descongelamiento en los tejidos se puede llegar a producir daño a las membranas, dando un incremento del flujo de iones y solutos orgánicos a través de las membranas celulares. El catión más importante que pierde la célula es el K⁺ (Al-Zoubi & Normah, 2015; Kaczmarczyk et al., 2012). Pocos reportes existen acerca del análisis de la pérdida de iones relacionado con el daño en los tejidos debido a los protocolos de crioconservación (Martínez-Montero, Martínez, & Engelmann, 2008; Pukacki & Juszczak, 2015). Por tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de los crioprotectores en la morfología y pérdida iónica de yemas axilares de vid bajo tres condiciones de crioconservación basadas en la vitrificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. "Flame seedless" provenientes del viñedo Casas Grandes, ubicado en el kilómetro 40 carretera 36 norte, en la Costa de Hermosillo, Sonora, México (29°02'41.0"N, 111°43'59.3"W). Las varetas conteniendo entre 5 y 7 yemas axilares fueron desinfectadas de acuerdo a lo reportado por Lazo-Javalera et al. (2016).

Protocolos de crioconservación

La metodología de vitrificación se desarrolló de acuerdo con lo descrito por Matsumoto y Sakai (2003) con algunas modificaciones. Se evaluaron tres soluciones crioprotectoras: (1) la solución de vitrificación PVS2 (Sakai, Kobayashi, & Oiyama, 1990), la cual contiene glicerol 30% (p/v), etilen-glicol 15% (m/v), DMSO 15% (p/v) y sacarosa 0.4 M disueltos en medio MS (Murashige & Skoog, 1962); (2) la solución de vitrificación PVS3 (Nishizawa, Sakai, Amano, & Matsuzawa, 1993), compuesta de glicerol 50% (p/v) y sacarosa 50% (p/v) disueltos en medio MS; (3) glicerol 100% (m/v). Se utilizaron cinco réplicas de cinco yemas por criovial de 1.5ml para cada tratamiento. Las yemas disectadas y previamente desinfectadas se incubaron en cada solución crioprotectora en

agitación a 100 rpm a 25 ± 2 °C durante 0, 30, 60, 90, 120, 180, 210, 240, 300 y 420 min, incluyendo el control sin crioprotección. De manera posterior a cada tiempo de incubación se sumergieron por una hora en NL y se descongelaron en un baño María a 38 °C por tres min.

Cuantificación de viabilidad

La viabilidad se cuantificó con base en la pérdida iónica de acuerdo con lo reportado por Martínez-Montero et al. (2008). Inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos, las yemas tratadas y controles de cinco réplicas conteniendo cinco yemas cada una fueron incubadas en 20ml de agua desionizada y colocadas en agitación a 100 r.p.m. a 25 °C por 24 h para medir la conductividad utilizando un conductímetro (Cole Palmer Instrument Co., Chicago, Illinois). Aparte, en otro grupo de tres réplicas conteniendo tres yemas, a cada una se le realizó un corte longitudinal y fueron observadas en un microscopio-estereoscopio (Daigger Scientific Inc.) para detectar posibles cambios en la morfología del tejido. Los datos se analizaron mediante varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer a un nivel de significancia de 95%, por medio de NCSS versión 2007.

RESULTADOS

El porcentaje de viabilidad después de los diversos tiempos de contacto con la solución PVS2 con y sin NL se muestra en la figura 1 (A) y se observó un decremento en la viabilidad al aumentar el tiempo de exposición con la solución PVS2, alcanzando un valor mínimo de 35% a los 300 min de incubación, con una reducción de viabilidad cerca de 50%. Por otro lado, después de una hora de almacenamiento en NL (figura 1[A]) se detectó que los valores de viabilidad se mantuvieron constantes, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tiempos de incubación. En estos tejidos (PVS2+NL) la viabilidad máxima fue de 10%.

El porcentaje de viabilidad de las yemas expuestas a la solución crioprotectora PVS3 con o sin NL se muestran en la figura 1(B). Los valores de viabilidad en yemas expuestas a PVS3 tienden a disminuir con respecto al tiempo de incubación alcanzando un mínimo de 60% a los 400 min; sin embargo, la reducción en la viabilidad con respecto al tiempo inicial fue de 30%. Por otro lado, la viabilidad de las yemas en PVS3 y una hora en NL mostraron un comportamiento de campana, donde

a los 120 min se obtiene un máximo en la viabilidad (35%). Al comparar los porcentajes de viabilidad máxima obtenida después de NL con las soluciones crioprotectoras utilizadas, se encontró que las yemas tratadas con PVS3 mostraron una mayor viabilidad (35%) en comparación con la observada con el tratamiento PVS2 (10%) (figuras 1 [A y B]).

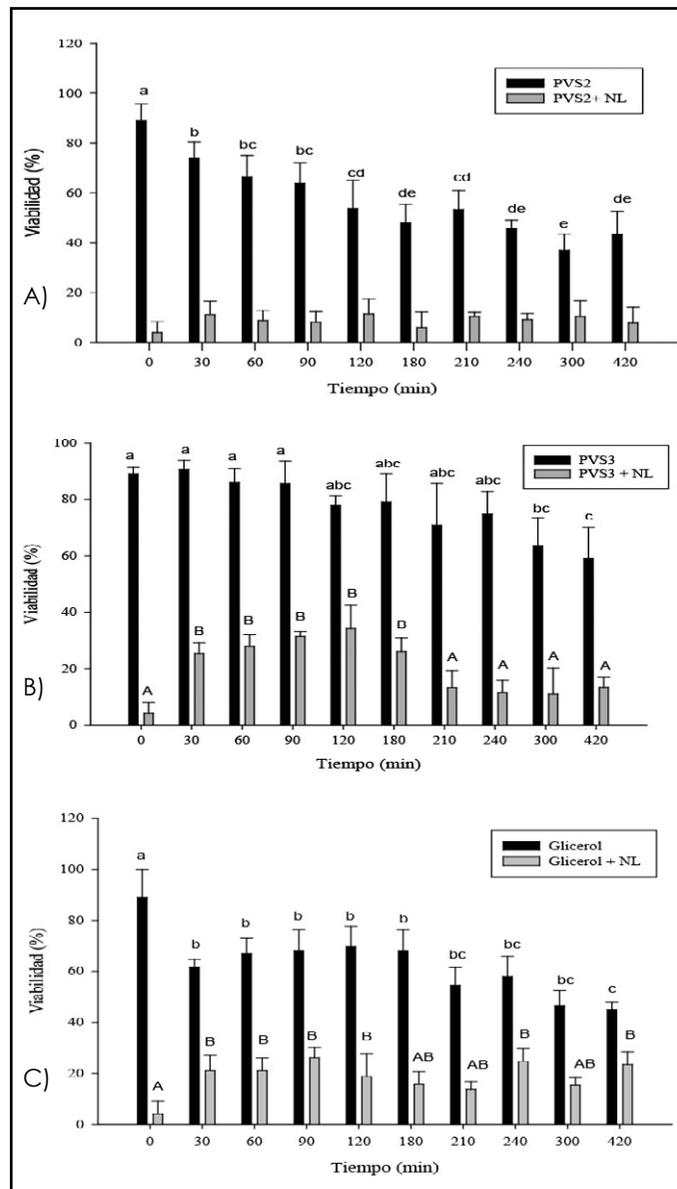


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.). (A) Sometidas a la solución crioprotectora PVS2 (barras oscuras) y PVS2 y una hora en NL (barras grises) (B) Exposición en la solución crioprotectora PVS3 (barras oscuras) y PVS3 y una hora en NL (barras grises). (C) exposición en glicerol (barras oscuras) y glicerol y una hora en NL (barras grises). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$). Elaboración propia.

Los valores de viabilidad empleando como crioprotector al glicerol con y sin NL se muestran en la figura 1 [C]. En este caso, se observa un decremento desde 90% hasta 60% de viabilidad a partir de los 30 min de exposición, lo que indica un drástico daño al tejido. Después de estos primeros 30 min la viabilidad se mantuvo en esos niveles hasta alcanzar un mínimo de 45% a los 300-420 min. Después de una hora en NL se obtuvieron valores promedio de 20-25% de viabilidad para todos los tiempos de incubación.

Las imágenes del corte longitudinal de las yemas expuestas a PVS2 y crioconservadas se muestran en la figura 2. Se observó un ligero oscurecimiento

en los tejidos después de 30 min de contacto con la solución crioprotectora PVS2 (figura 2 [A]). De igual forma, se detectó un incremento en el daño (enturbiamiento del tejido meristemático) de las yemas conforme aumenta el tiempo de incubación. Por otra parte, en las imágenes después de PVS2 y una hora en NL (figura 2 [C, E, G, I, K, M, O, Q y S]) aumentó el oscurecimiento o afectación en las yemas, se expresa con mayor intensidad en tiempos de mayor exposición (300 y 420 min) (figura 2 [Q y S]). Este comportamiento concuerda con los bajos niveles (<10%) de viabilidad observados en las yemas expuestas a PVS2 y una hora en NL (figura 1 [A]).

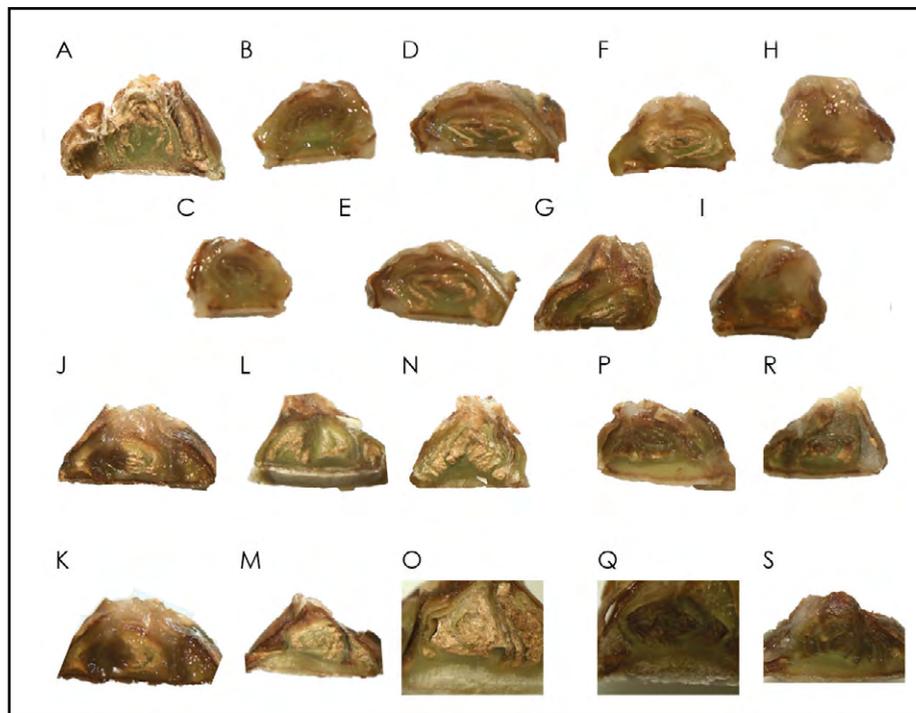


Figura 2. Yemas axilares de vid sometidas a vitrificación-crioconservación mediante PVS2. A) yema control sin ningún tratamiento, B) después de 30 min de incubación, C) 30 min en PVS2 + 1h en NL, D) 60 min de incubación, E) 60 min en PVS2 + 1h en NL, F) 90 min de incubación, G) 90 min en PVS2 + 1h en NL, H) 120 min de incubación, I) 120 min en PVS2 + 1h en NL, J) 180 min de incubación, K) 180 min en PVS2 + 1h en NL, L) 210 min de incubación, M) 210 min en PVS2 + 1h en NL, N) 240 min de incubación, O) 240 min en PVS2 + 1h en NL, P) 300 min de incubación, Q) 300 min en PVS2 + 1h en NL, R) 420 min de incubación y S) 420 min en PVS2 + 1 h en NL. Elaboración propia.

En las imágenes de las yemas sometidas a PVS3 y crioconservadas mostradas en la figura 3 se detectó un menor daño en los tejidos después de la incubación con PVS3 (figura 3 [B, D, F y H]) con respecto al tiempo inicial (figura 3 [A]), solamente al tiempo máximo de exposición de 420 min (figura 3 [R]) se encontró un ligero oscurecimiento en la parte

superior de la yema (figura 1 [B]). En las imágenes de las yemas en PVS3 y NL (Figura 3 [C, E, G, I, K, M, O, Q y S]) se observó que mantienen las características similares a las yemas sin NL y el control. Mayores daños se detectaron en los tejidos después de 210 min de incubación en PVS3 y NL (Figura 3 [M, O, Q y S]) y precisamente estos tejidos presentaron menor

viabilidad (10-15%) (figura 1 [B]). De acuerdo con esto, se considera un rango de tiempo óptimo de incubación entre los 90-120 min en PVS3, que fue donde se obtuvo mayor viabilidad (35%) después de NL. Además, las yemas no mostraron oscurecimiento (figura 3 [G e I]), lo cual indica que este tiempo de incubación con la solución PVS3 puede ser el adecuado para la crioconservación de yemas axilares de vid.

De igual forma, al observar las yemas en el estereoscopio empleando al glicerol como crioprotector se puede ver que es insuficiente para proteger a las yemas del congelamiento, debido a que se detectó un mayor oscurecimiento y una reducción en el espacio meristemático (pérdida de compartimentalización) en los tejidos con respecto al control. Esto fue en todos los tejidos, tanto en

glicerol como en glicerol y NL en los distintos tiempos de incubación (figura 4).

DISCUSIÓN

En la crioconservación de vid utilizando PVS2 como crioprotector se observó un decremento en la viabilidad en las yemas axilares después de los diversos tiempos de contacto con la solución PVS2 con y sin NL al aumentar el tiempo de exposición. Dicho comportamiento ha sido previamente reportado por Shatnawi (2011), donde evaluó dos soluciones de vitrificación PVS2 y MPVS2 (compuesto con glicerol al 20%, DMSO al 20%, etilenglicol al 20% y sacarosa al 20%) en meristemas de *Capparis spinosa* expuestos a distintos tiempos de incubación y observaron que conforme aumentaba el tiempo de incubación se obtenía un decremento muy marcado en la regeneración.

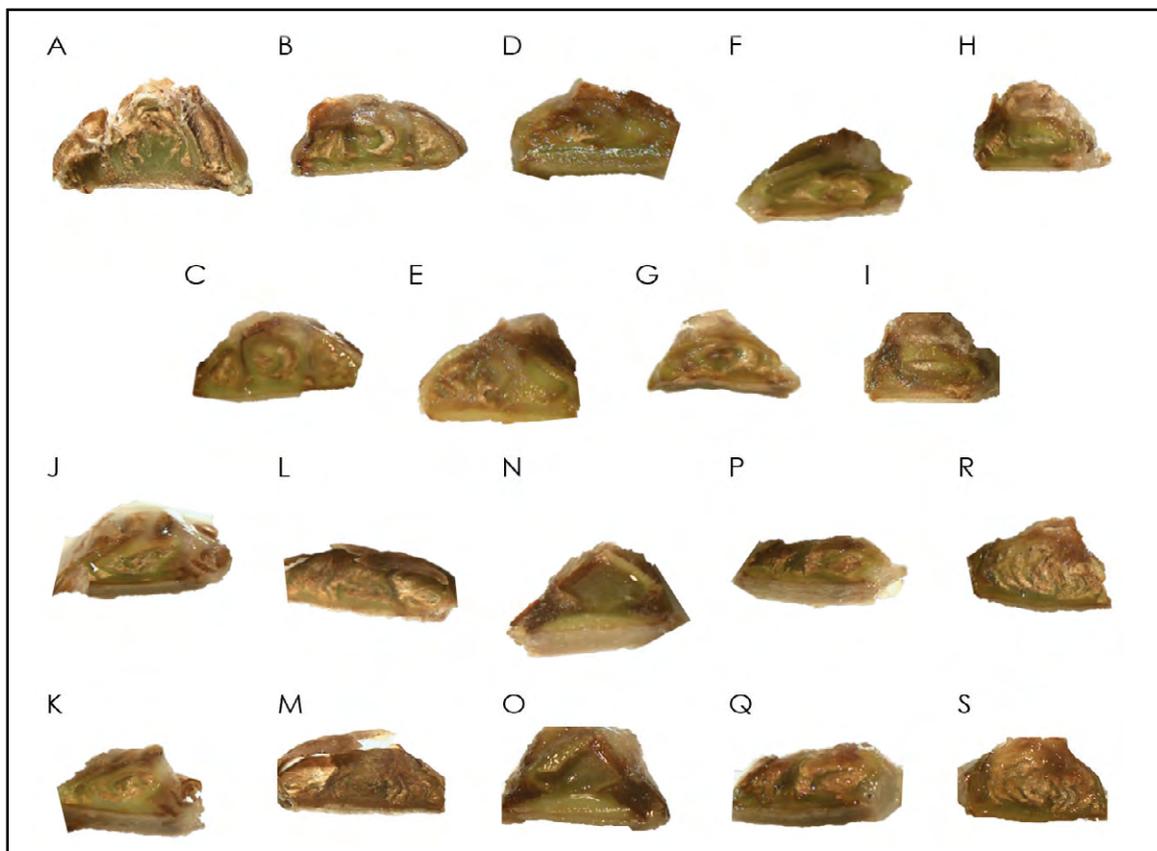


Figura 3. Yemas axilares de vid sometidas a vitrificación-crioconservación mediante PVS3. A) Yema control sin ningún tratamiento, B) después de 30 min de incubación, C) 30 min en PVS3 + 1h en NL, D) 60 min de incubación, E) 60 min en PVS3 + 1h en NL, F) 90 min de incubación, G) 90 min en PVS3 + 1h en NL, H) 120 min de incubación, I) 120 min en PVS3 + 1h en NL, J) 180 min de incubación, K) 180 min en PVS3 + 1h en NL, L) 210 min de incubación, M) 210 min en PVS3 + 1h en NL, N) 240 min de incubación, O) 240 min en PVS3 + 1h en NL, P) 300 min de incubación, Q) 300 min en PVS3 + 1h en NL, R) 420 min de incubación y S) 420 min en PVS3 + 1 h en NL. Elaboración propia.

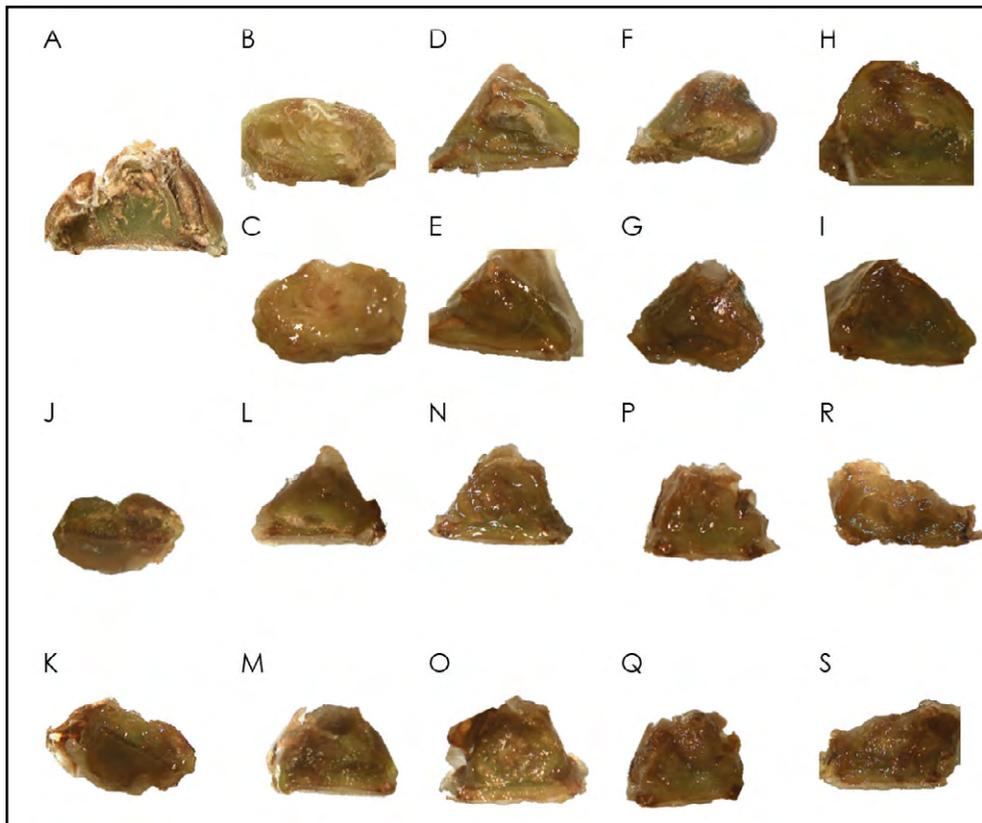


Figura 4. Yemas axilares de vid sometidas a vitrificación-crioconservación utilizando glicerol como crioprotector. A) Yema control sin ningún tratamiento, B) después de 30 min de incubación, C) 30 min en glicerol + 1h en NL, D) 60 min de incubación, E) 60 min en glicerol + 1h en NL, F) 90 min de incubación, G) 90 min en glicerol + 1h en NL, H) 120 min de incubación, I) 120 min en glicerol + 1h en NL, J) 180 min de incubación, K) 180 min en glicerol + 1h en NL, L) 210 min de incubación, M) 210 min en glicerol + 1h en NL, N) 240 min de incubación, O) 240 min en glicerol + 1h en NL, P) 300 min de incubación, Q) 300 min en glicerol + 1h en NL, R) 420 min de incubación y S) 420 min en glicerol + 1 h en NL. Elaboración propia.

Por otro lado, después de una hora de almacenamiento en NL se observó que los valores de viabilidad se mantuvieron constantes y bajos, indicando que ninguno de los tiempos de contacto con PVS2 fue adecuado para brindar protección a las yemas y, por tanto, mantener su viabilidad celular. Estos resultados son similares a lo reportado por Wang et al. (2014), donde observaron que la solución de PVS2 causó mayor daño en los ápices de papa, dando como resultado más tiempo de recuperación y baja regeneración de los tejidos después estar en NL; así como lo reportado en brotes adventicios de *Paraisometrum mileense*, donde el tratamiento con PVS2 afectó considerablemente la regeneración y se obtuvo un óptimo de sobrevivencia a los 90 min (Lin, Yuan, Wang, & Li, 2014).

Se observó también un incremento en el daño (oscurecimiento de tejido meristemático)

de las yemas conforme aumentaba el tiempo de incubación. Lo anterior puede deberse a que el etilenglicol y el DMSO, componentes de la solución PVS2, moléculas permeables, pueden inducir permeabilidad a la membrana e incrementar la difusión del glicerol. El incremento intracelular que se lleva a cabo pudiera provocar un efecto dañino a las células en lugar de una crioprotección (Volk, Harris, & Rotindo, 2006, p. 305). En este sentido, se reportó en brotes de *Mentha x piperita* L. cv Todd Mitchman Peppermint (PI 557973) expuestos a soluciones de crioprotectores (PVS2 y PVS3), que la solución PVS2 fue más dañina que PVS3 para la sobrevivencia de los tejidos y este efecto fue atribuido al glicerol presente en la solución en combinación con los otros crioprotectores, como el DMSO y etilenglicol (Volk et al., 2006). También el tiempo de exposición es clave para el mantenimiento de la integridad celular. Ganino et al. (2012) detectaron la presencia de

células plasmolizadas en tejidos de *Vitis Berlandieri* x *V. riparia* desde los primeros 30 min de exposición a PVS2. Un corte transversal de yema axilar de vid se muestra en la figura 5.



Figura 5. Corte transversal de una yema axilar de vid (*Vitis vinifera* L.). Elaboración propia.

Los valores de viabilidad observados en el presente trabajo en las yemas expuestas a PVS3 tienden a disminuir con respecto al tiempo de incubación, en donde es mayor la pérdida de viabilidad en tejidos expuestos a PVS2. Se ha sugerido que los grupos OH presentes en los azúcares/polialcoholes que se encuentran en mayor cantidad en la solución PVS3, comparada con la cantidad de estos compuestos en PVS2, reemplazan el agua e interactúan con los fosfolípidos y forman uniones con los estos elementos de la membrana. Esto ayuda a estabilizar las membranas celulares durante la deshidratación y congelamiento en NL y brinda una mayor integridad de membranas (Pereira & Hünenberger, 2006, p. 15572). En el presente trabajo se obtuvo mayor porcentaje de viabilidad en las yemas tratadas con PVS3 a un tiempo de exposición de 120 min después de NL, se mostró mayor protección con respecto a la solución PVS2; al igual que los resultados obtenidos en ápices de ajo, donde compararon dichas soluciones crioprotectoras y obtuvieron mayor regeneración con la solución PVS3 (Makowska, Keller, & Engelmann, 1999).

En este sentido, Volk et al. (2006) reportaron que el glicerol y la sacarosa, componentes de la solución PVS3, pueden ejercer mejor efecto protector, pero requieren de mayor tiempo de exposición para que

el glicerol y la sacarosa puedan penetrar dentro de la célula y lograr así su acumulación, a diferencia de PVS2, que contiene DMSO y etilenglicol, los cuales por ser más permeables requieren menor tiempo de exposición. Por otra parte, la capacidad del glicerol para penetrar la membrana celular y de la sacarosa agente no penetrante actúan incrementando la osmolaridad dentro y fuera de la célula, así como reduciendo el contenido de agua. Por tanto, los crioprotectores contenidos en PVS3 pueden generar un ambiente propicio para conservar los tejidos (Benson, 2008, p. 15) y proteger mejor a las yemas de vid que PVS2 y glicerol.

Los valores obtenidos de viabilidad empleando como crioprotector al glicerol con y sin NL muestran mayor daño al tejido. Este comportamiento no se presentó con las soluciones crioprotectoras PVS2 y PVS3. Sin embargo, al observar las yemas en el estereoscopio se puede ver que el glicerol como crioprotector fue insuficiente para proteger a las yemas del congelamiento, debido a que se detectó mayor oscurecimiento y reducción en el espacio meristemático (pérdida de compartimentalización) en los tejidos respecto al control. En este sentido, Mazur (1960) reportó que el oscurecimiento del tejido es una de las primeras señales de daño detectable y ocurre como resultado de las bajas temperaturas, debido que el congelamiento provoca excesiva deshidratación y/o la formación de cristales de hielo; además de la pérdida de compartimentalización celular debido al eflujo de compuestos fenólicos y otros iones y como consecuencia la formación de complejos insolubles, los cuales tienden a oxidarse, dando como resultado el oscurecimiento en los tejidos (Chalker-Scott, Fuchigami, & Harber, 1989). Los datos aquí mostrados concuerdan con el hecho de que es imprescindible la optimización de la concentración, del tipo y tiempo de exposición de los crioprotectores para mantener la integridad y viabilidad celular en los tejidos crioconservados, lo cual también es dependiente del tejido y cultivar (Bhattacharya & Prajapati, 2016).

CONCLUSIONES

Los resultados aquí mostrados sugieren que el protocolo basado en la vitrificación mediante PVS3 puede ser considerado para la preservación del germoplasma de vid mediante crioconservación.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar el soporte económico para llevar a cabo este proyecto bajo el proyecto No.

000000000168895. Los autores agradecen de igual forma al Ing. Ramiro Domínguez-Martínez por su apoyo técnico en campo para la colecta de las variedades de vid.

REFERENCIAS

- Al-Zoubi, O. M., & Normah, M. N. (2015). Ultrastructural response of embryonic axes of *Fortunella polyandra* to dehydration and cryopreservation. *Cryo-Letters*, 36(6), 379-391. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2015/00000036/00000006/art00004>
- Bayati, S., Shams-Bakhsh, M., & Moini, A. (2011). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. En *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(3), 443-450. Recuperado de http://journals.modares.ac.ir/article_4713_c51d0b2176daee020a071e9d33f2aa51.pdf
- Ben-Amar, A., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G., & Mliki, A. (2013). Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. En *Scientia Horticulturae*, 157, 32-38. doi:10.1016/j.scienta.2013.04.005
- Benson, E. E. (2008). Cryopreservation Theory. En B. M. Reed (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* (pp. 15-30). New York, NY: Springer.
- Bhattacharya, S., & Prajapati, B. G. (2016). A review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(3), 154-159. doi: 10.22377/ajp.v10i3.721
- Chalker-Scott, L., Fuchigami, L. H., & Harber, R. M. (1989). Spectrophotometric measurement of leached phenolic compounds as an indicator of freeze damage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114, 315-319. Recuperado de <https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/25663/CHALKERSCOTTLINDA1989.pdf?sequence=1#page=74>
- Engelmann, F. (2012). Germplasm collection, storage and preservation. En A. Altman & P. M. Hazegawa (Eds.), *Plant biotechnology and agriculture-Prospects for the 21st Century* (pp. 255-268). Oxford, UK: Academic Press.
- Ganino, T., Silvanini, A., Beghé, D., Benelli, C., Lambardi, M., & Fabbri, A. (2012). Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. *Biologia Plantarum*, 56(1), 78-82. doi: <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0019-0>
- González-Arno, M. T., Panta, A., Roca, W. M., Escobar, R. H., & Engelmann, F. (2008). Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92(1), 1-13. doi: 10.1007/s11240-007-9303-7
- González-Benito, M., Martín, C., & Vidal, J. (2009). Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars 'Albariño' and 'Tempranillo'. *Vitis*, 48(3), 131-136. Recuperado de <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/w1%2009%201298.pdf>
- Kaczmarczyk, A., Menon, A., Al-Hanbali, A., Funnekotter, B., Bunn, E., Phang, P. Y., & Mancera, R. L. (2012). Current issues in plant cryopreservation. En I. Katkov (Ed.), *Current frontiers in cryobiology* (592 pp.). Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher. doi: 10.5772/32860
- Kaviani, B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 778-800. Recuperado de http://www.cropj.com/kaviani_5_6_2011_778_800.pdf
- Lazo-Javalera, M. F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E., Martínez-Téllez, M. A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., & Rivera-Domínguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5, 453. doi: 10.1186/s40064-016-2081-0
- Lin, L., Yuan, B., Wang, D., & Li, W. (2014). Cryopreservation of adventitious shoot tips of *Paraisometrum Mileense* by droplet vitrification. En *CryoLetters*, 35(1), 22-28. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2014/00000035/00000001/art00004>
- Liu, G. T., Wang, J. F., Cramer, G., Dai, Z. W., Duan, W., Xu, H. G.,..., Li, S. H. (2012). Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves during and after recovery from heat stress. *BMC Plant Biology*, 12, 174. doi:10.1186/1471-2229-12-174
- Makowska, Z., Keller, J., & Engelmann, F. (1999). Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. En *CryoLetters*, 20(3), 175-182. Recuperado de <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010018253>
- Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J., & Engelmann, F. (2013). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. *Open Life Sciences*, 8(10), 993-1000. doi: 10.2478/s11535-013-0223-8
- Martínez-Montero, M. E., Martínez, J., & Engelmann, F. (2008). Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. *CryoLetters*, 29(3), 229-242. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2008/00000029/00000003/art00006>

- Matsumoto, T., & 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. doi: 10.1023/A:1024024909864
- Mazur, P. (1960). Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 85, 610-629. doi: 10.1111/j.1749-6632.1960.tb49986.x
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., & Matsuzawa, T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus-Officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91(1), 67-73. doi: 10.1016/0168-9452(93)90189-7
- Pathirana, R., Mclachlan, A., Hedderley, D., Panis, B., & Carimi, F. (2016). Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 12. doi: 10.1007/s11738-015-2026-1
- Pereira, C. S., & Hünenberger, P. H. (2006). Interaction of the sugars trehalose, maltose and glucose with a phospholipid bilayer: a comparative molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(31), 15572-15581. doi: 10.1021/jp060789l
- Pukacki, P. M., & Juszczak, K. (2015). Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryogenic axes of the seeds of two *Acer* species. *Trees*, 29(2), 385-396. doi: 10.1007/s00468-014-1118-7
- Sakai, A., & Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *CryoLetters*, 28(3), 151-172. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2007/00000028/00000003/art00002>
- Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33. doi: 10.1007/BF00232130
- Shatnawi, M. A. (2011). Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification. *World Applied Sciences Journal*, 15(3), 318-325. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/3391/bbb8d5458f05f7a1a7fe3bc57002925c94b0.pdf>
- Teixeira, A. S., González-Benito, M. E., & Molina-García, A. D. (2013). Glassy state and cryopreservation of mint shoot tips. *Biotechnology Progress*, 29(3), 707-717. doi:10.1002/btpr.1711
- Vasanth, K., & Vivier, M. A. (2011). Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine. *Biologia Plantarum*, 55(2), 365-369. doi: 10.1007/s10535-011-0056-0
- Volk, G. M., Harris, J. L., & Rotindo, K. E. (2006). Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52(2), 305-308. doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.11.003
- Wang, B., Li, J. W., Zhang, Z. B., Wang, R. R., Ma, Y. L., Blystad, D. R.,..., Wang, Q. C. (2014). 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. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.021
- Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann, F., Chen R., & Zhao, Y. (2003). Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using rapid. *CryoLetters*, 24(5), 315-322. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2003/00000024/00000005/art00006>