

# Etapas del protocolo de crioconservación y su efecto sobre la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinífera* L.)

Stages of the cryopreservation protocol and its effect on the viability and regeneration of grapevine zygotic embryos (*Vitis vinífera* L.)

Deanna Esquivel-Figueroa<sup>1</sup>, Martín Ernesto Tiznado-Hernández<sup>2</sup>, María Auxiliadora Islas-Osuna<sup>2</sup>, María Fernanda Lazo-Javalera<sup>3</sup> y Marisela Rivera-Domínguez<sup>1\*</sup>✉

<sup>1</sup> Coordinación de Ciencia de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria. Hermosillo, Sonora. C.P. 83304. México.

<sup>2</sup> Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria. Hermosillo, Sonora. C.P. 83304. México.

<sup>3</sup> Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. Carretera 100 a Bahía de Kino km. 21.5, Hermosillo, Sonora, México.

## RESUMEN

La vid es uno de los principales cultivos del mundo y el Estado de Sonora es el mayor productor de México. Este cultivo está en constante peligro por diversos factores bióticos y abióticos, de ahí la importancia de su conservación. La crioconservación es idónea para este cultivo, pero puede provocar alteraciones fisiológicas, moleculares y bioquímicas, afectando la viabilidad y la regeneración. Por lo anterior, en este trabajo se planteó analizar el efecto de las etapas del protocolo de crioconservación sobre la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid. La viabilidad del tejido (V) y la regeneración de plántulas (RP), mostraron que la solución 2 de vitrificación de plantas (PVS2) ejerce protección a los embriones (V: 85 %, RP: 60 %), mientras que la exposición combinada a la solución PVS2 y nitrógeno líquido (NL) ocasionó disminución de la viabilidad y regeneración (V: 68 %; RP: 2 %). Un efecto más drástico se observó cuando el tejido fue expuesto a PVS2+NL y recalentamiento (RC) (V: 68 %; RP: 0 %). Sin embargo, la viabilidad y la regeneración se recuperó cuando el tejido se sometió a PVS2+NL+RC y solución de descarga (SD) (V: 92 %; RP: 60 %). Se concluye que la utilización de la solución de descarga es fundamental para disminuir daños a los tejidos debido a las diferentes etapas de crioconservación.

**Palabras clave:** crioprotector, nitrógeno líquido, vitrificación

## ABSTRACT

The grapevine is one of the main crops in the world, and Sonora State is the largest producer in Mexico. This crop is in constant danger due to various biotic and abiotic factors, therefore the importance of its conservation. Cryopreservation is ideal for this culture, but it can cause physiological, molecular, and biochemical alterations, affecting viability and regeneration. Hence, this work analyzed the effect of cryopreservation protocol stages on the viability and regeneration of grapevine zygotic embryos. Tissue viability (V) and plantlets regeneration (RP) showed that plant vitrification solution 2 (PVS2) protects embryos (V: 85 %, RP: 60 %), while

combined exposure to PVS2 solution and liquid nitrogen (LN) caused decreased viability and regeneration (V: 68 %; RP: 2 %). A more drastic effect was observed when the tissue was exposed to PVS2+LN and rewarming (RW) (V: 68 %; RP: 0 %). However, viability and regeneration were recovered when the tissue was subjected to PVS2+LN+RW and unloading solution (US) (V: 92 %; RP: 60 %). It is concluded that the use of the unloading solution is essential to decrease tissue damage due to the different stages of cryopreservation.

**Key words:** cryoprotectant, liquid nitrogen, vitrification

## INTRODUCCIÓN

La crioconservación es una técnica que permite conservar el germoplasma de tejidos y células en nitrógeno líquido (NL) a una temperatura de - 196 °C con el uso de osmo y crioprotectores (González-Arno *et al.*, 2014; Nausch y Buyel, 2021). Entre los crioprotectores se encuentra la solución 2 de vitrificación de plantas (PVS2), la cual está compuesta por: glicerol 30 % (p/v), etilen-glicol 15 % (p/v), dimetilsulfóxido (DMSO) 15 % (p/v) y sacarosa 0.4 M. La PVS2 ha sido descrita como una solución crioprotectora eficiente y es la solución de vitrificación más utilizada para la crioconservación de tejidos vegetales (Sakai *et al.*, 1990; Normah *et al.*, 2019). Los componentes de esta solución interactúan con las moléculas de agua mediante fuerzas dipolo y puentes de hidrógeno, para disminuir la cantidad de moléculas de agua libres y así evitar se forme cristales de hielo extra e intracelular (Nausch y Buyel, 2021). Sin embargo, no optimizar las condiciones durante las distintas etapas de la crioconservación puede inducir alteraciones bioquímicas, fisiológicas y moleculares (Kaity *et al.*, 2008; Rahmah *et al.*, 2015; Zakaria *et al.*, 2020; Quijada-Rivera *et al.*, 2023), influyendo en la viabilidad y regeneración de los tejidos. Esto, es aún controversial, ya que algunos trabajos reportan que la crioconservación es una técnica eficiente, mientras que otros mencionan lo contrario. En este sentido, Martínez-Montero *et al.* (2012) y Souza *et al.* (2016) establecieron un protocolo de crioconservación para puntas de brote de *Ananas comosus* L., que no afectó el ren-

\*Autor para correspondencia: Marisela Rivera-Domínguez  
 Correo-e: marisela@ciad.mx

Recibido: 10 de marzo de 2023

Aceptado: 23 de octubre de 2023

Publicado: 13 de noviembre de 2023

dimiento en campo de las puntas de brote crio conservadas (Villalobos-Olivera *et al.*, 2019). Bettoni *et al.* (2019) reportaron el 50 - 55 % de regeneración en puntas de brote crioconservadas de *Vitis*. Ganino *et al.* (2012) reportó plasmólisis en puntas de brote del híbrido Kober 5 BB (*Vitis berlandieri* y *Vitis riparia*) debido a la vitrificación. Además, en yemas axilares de vid se encontró que la deshidratación provocó un aumento del malondialdehído y el recalentamiento causó variabilidad genética. Mas aún, la PVS2 y el glicerol provocaron obscurecimiento del tejido (Lazo-Javalera *et al.*, 2015; 2016; 2017). García-Coronado *et al.* (2016) reportaron alteración en los niveles de expresión del ADN metiltransferasas por la vitrificación en embriones cigóticos de vid cv. Red Globe. De ahí la importancia de evaluar las alteraciones que puede provocar cada etapa del protocolo de crioconservación. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto sobre la viabilidad y regeneración del tejido en respuesta a las distintas etapas del proceso de crioconservación para la optimización del protocolo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los embriones cigóticos se extrajeron de semillas de uvas de la variedad Red Globe obtenidas de mercados de abastos de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Las frutas seleccionadas fueron lavadas con agua destilada y con jabón (detergente en polvo), y luego enjugadas con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente, se extrajeron las semillas de las bayas, y se realizó una prueba de viabilidad de semillas mediante flotación en agua destilada, para separar las pseudo-semillas (semillas que flotan) de las semillas llenas (semillas que precipitan) (Ugbede y Hamadina, 2018). Las semillas que precipitaron se desinfectaron con etanol al 70 % (v/v) por 1 min, después con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 7 min, y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. En caso de ser necesario, las semillas se colocaron dentro de medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) hasta por 15 d, para el desarrollo y maduración del embrión. Después, las semillas se trataron con 1000 ppm de ácido giberélico por 24 h a 25 °C, con la excepción del tratamiento control. Al finalizar el tratamiento con ácido giberélico, las semillas fueron diseccionadas con la ayuda del bisturí y el estereoscopio dentro de la campana de flujo laminar (Horizontal Laminar Flow Cabinet, Esco Airstream®) bajo condiciones estériles (Daigger Scientific Inc.) para la extracción de los embriones (1 a 3 mm de longitud), los cuales fueron colocados dentro de crio-viales de 2 mL para realizar los tratamientos del protocolo de la crioconservación.

### Crioconservación

La crioconservación se realizó de acuerdo a lo descrito por García-Coronado *et al.* (2016). Los embriones fueron expuestos a PVS2 [30 % (p/v) glicerol, 15 % (p/v) etilenglicol y 15 % (p/v) de dimetilsulfóxido (DMSO)] al 50 % por 10 min a 25 °C y después fueron expuestos a PVS2 al 100 % por 10 min a 4

°C. Posteriormente, se sumergieron en NL (-196 °C) durante 30 min y después fueron recalentados en baño de María a 38 °C por 3 min. Finalmente, se expusieron a solución de descarga (1.2 M sacarosa) durante 7 min a 25°C. Los tratamientos fueron T1: embriones sin tratamiento (control), T2: embriones expuestos a NL, T3: embriones expuestos a PVS2, T4: embriones expuestos a PVS2+NL, T5: embriones expuestos a PVS2+NL+RC y T6: embriones expuestos a PVS2+NL+RC+SD. En cada tratamiento se realizaron 5 réplicas con 5 embriones cada una.

### Análisis de viabilidad

La viabilidad se determinó mediante la técnica de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) de acuerdo a García-Coronado *et al.* (2016) y De Souza Grzybowski *et al.* (2012). Los embriones se colocaron en TTC (1 %) dentro de cajas Petri durante 24 h a 30 °C en obscuridad, y posteriormente fueron observados bajo microscopio estereoscopio.

### Regeneración

La regeneración de plántulas se realizó colocando los embriones (T1-T6) en medio de regeneración conteniendo macronutrientes, micronutrientes y vitaminas MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado y suplementado con 0.035 mg/L de ácido giberélico, 50 mg/L de mio-inositol, 50 mg/L de hidrolizado de caseína, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, 3 g/L de carbón activado y 0.1 g/L de citrato de hierro (Tiznado Hernández *et al.*, 2015) e incubados a 26 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 15 d.

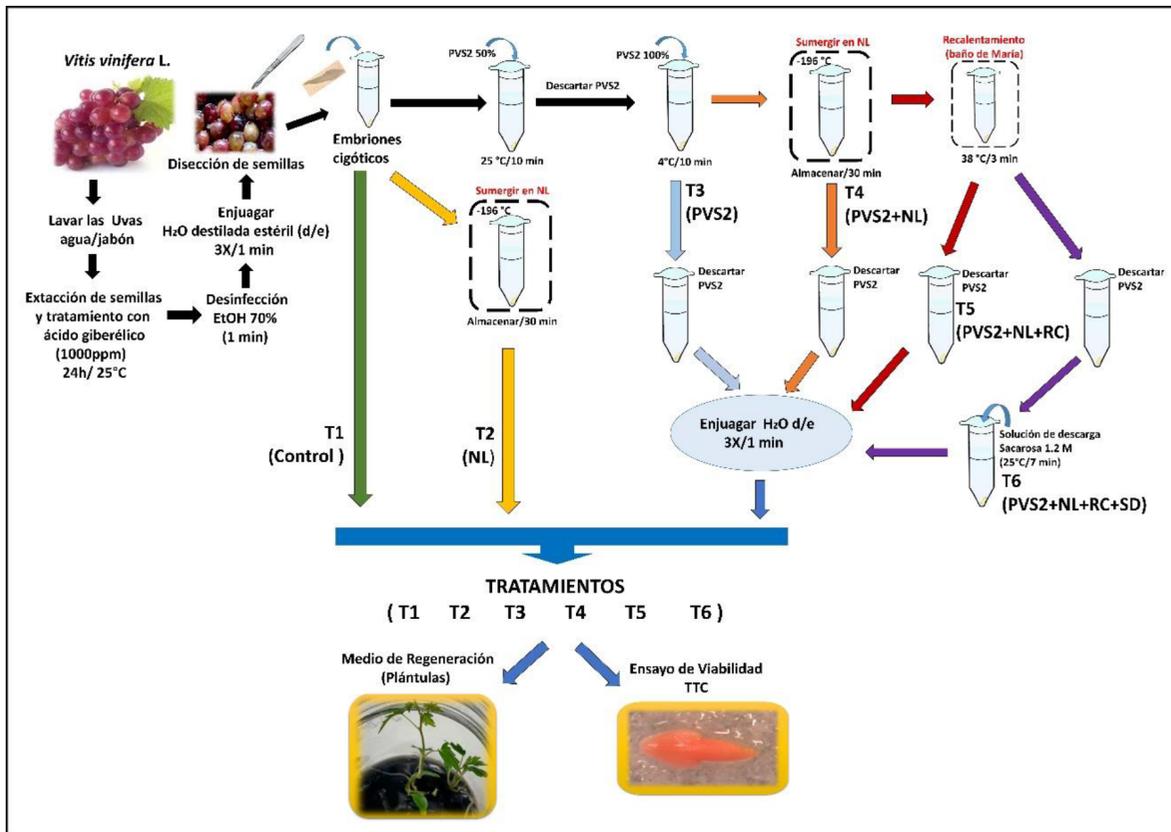
En la Figura 1 se muestra el esquema representativo de la evaluación de la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid expuestos a las distintas etapas del protocolo de crioconservación.

### Diseño experimental y análisis estadísticos

Se realizó un diseño completamente al azar, donde cada tratamiento (T1-T6) constó de 5 réplicas con 5 embriones cigóticos en cada réplica para cada análisis (viabilidad y regeneración). Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar las diferencias entre las medias, con un nivel de significancia del 95 %. Las variables respuesta fueron el porcentaje de viabilidad del análisis con TTC y el porcentaje de plántulas regeneradas, de acuerdo a los diferentes tratamientos (T1-T6). En los casos que mostraron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación de medias mediante el método de Tukey-Kramer. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico NCSS (Statistical Number System, Kaysville UTA, EUA; versión 2021, v21.0.2).

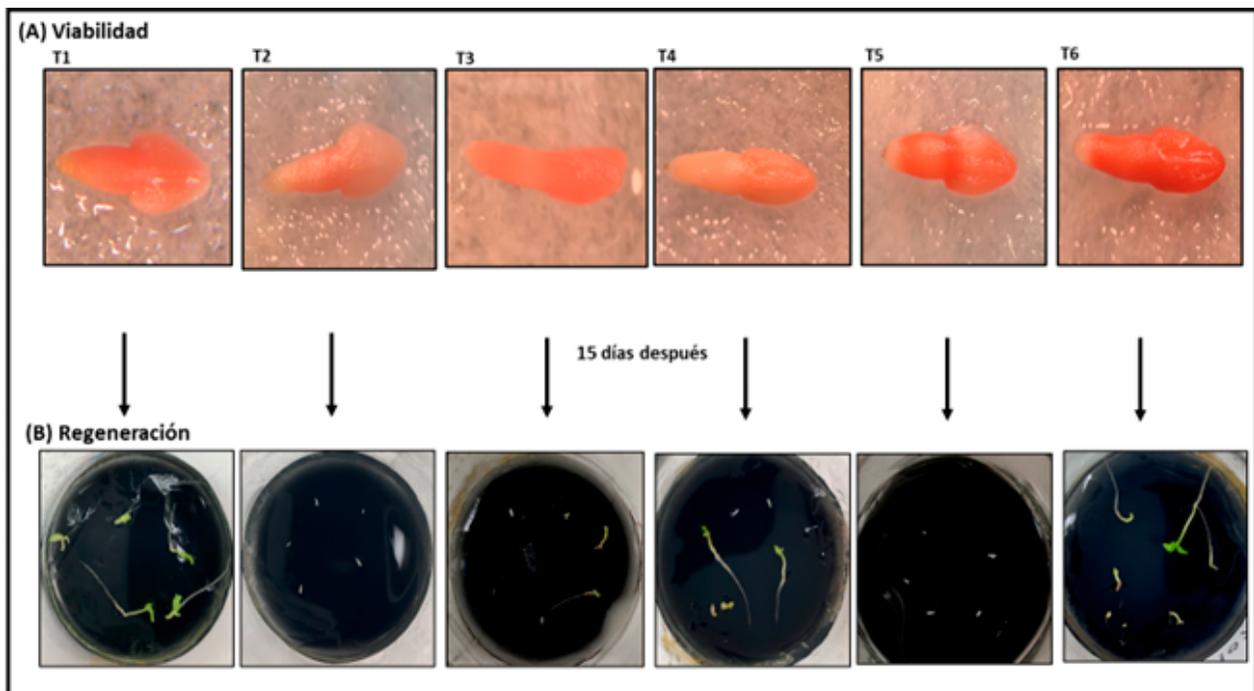
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viabilidad de los embriones cigóticos se vio afectada en algunos pasos del protocolo de crioconservación. En el análisis de viabilidad con cloruro de trifentiltetrazolio (TTC) (Figura 2A), se muestra que en el control (T1), en el tratamiento con



**Figura 1.** Diagrama representativo de la evaluación de la viabilidad y regeneración de embriones cigóticos de vid sometidos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD.

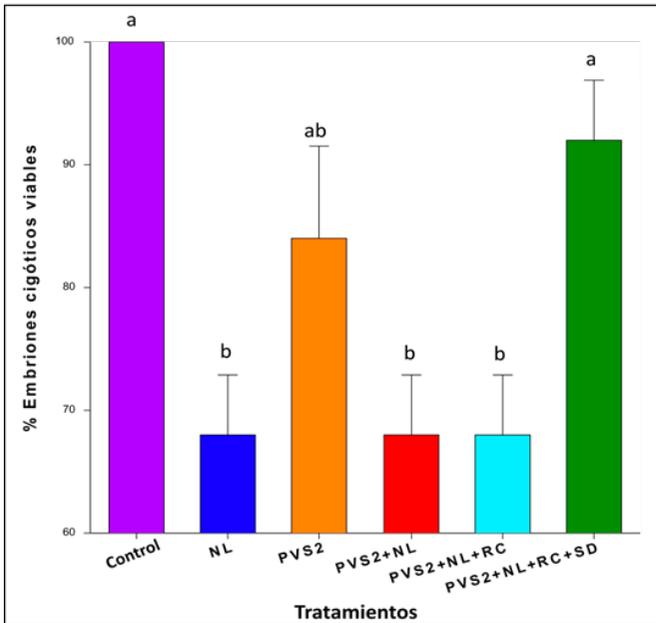
**Figure 1.** Representative diagram of the viability and regeneration assessment of grapevine zygotic embryos subjected to different stages of the cryopreservation protocol. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD.



**Figura 2.** Viabilidad y regeneración *in vitro* de embriones expuestos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. (A) Embriones teñidos con TTC y (B) Plántulas regeneradas a partir de embriones, sometidos a distintas etapas del protocolo de criopreservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD.

**Figure 2.** Viability and *in vitro* regeneration of embryos exposed at different stages of the cryopreservation protocol. (A) Embryos stained with TTC and (B) Seedlings regenerated from embryos, subjected to different stages of the cryopreservation protocol. T1: control, T2: NL, T4:PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD.

PVS2 (T3) así como el tratamiento con PVS2+NL+RC+SD (T6) muestran un color rojo por la formación de formazán que indica tejidos viables. Este color es más brillante y uniforme en comparación con los tratamientos NL (T2), PVS2+NL (T4), PVS2+NL+RC (T5). Este comportamiento se vio reflejado en la capacidad de regeneración *in vitro* de los embriones de los tratamientos T1, T3 y T6 después de 15 d en medio de regeneración (Figura 2B). En la Figura 2 se muestra que los embriones que presentaron mayor intensidad del formazán pudieron regenerarse y aquellos con baja intensidad de la coloración fueron los que tuvieron menor porcentaje de regeneración (T2 y T5).

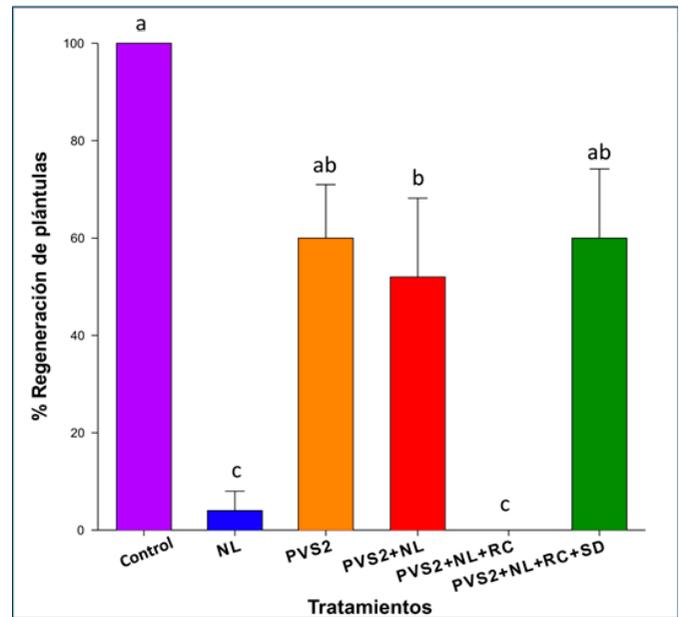


**Figura 3.** Porcentaje de embriones viables inmediatamente después de cada tratamiento de crioconservación. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS2+NL+RD+SD. Letras distintas muestran las diferencias significativas entre los tratamientos,  $p < 0.05$ .

**Figure 3.** Percentage of viable embryos immediately after each cryopreservation treatment. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD. Different letters show significant differences between treatments,  $p < 0.05$ .

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad (Figura 3) en los embriones de los tratamientos NL y PVS2+NL y PVS2+NL+RC, donde el valor osciló alrededor del 68 %, siendo el porcentaje de viabilidad más bajo en comparación con el control (100 %) y los tratamientos con PVS2 y PVS2+NL+RC+SD. Los embriones expuestos solo a PVS2 mostraron un porcentaje de viabilidad de 84 %, mientras que los expuestos al tratamiento PVS2+NL+RC+SD mostraron un 92 % de viabilidad, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) respecto al control (V: 100 %).

La regeneración de plántulas a partir de los embriones expuestos a las distintas etapas del protocolo (tratamientos) de crioconservación se puede observar en la Figura 4, donde se muestra que el control mostró el crecimiento óptimo de plántulas (RP: 100 %), mientras que en el tratamiento con NL el crecimiento fue casi nulo (RP: 4 %), lo cual puede rela-



**Figura 4.** Porcentaje de plántulas regeneradas después 15 días en medio de regeneración. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC y T6: PVS 2+NL+RD+SD. Letras diferentes muestran las diferencias significativas entre los tratamientos,  $p < 0.05$ .

**Figure 4.** Percentage of regenerated seedlings after 15 days in regeneration medium. T1: control, T2: NL, T3: PVS2, T4: PVS2+NL, T5: PVS2+NL+RC and T6: PVS 2+NL+RD+SD. Different letters show significant differences between treatments,  $p < 0.05$ .

cionarse con la baja intensidad de formazán en el ensayo de viabilidad con TTC (Figura 2A). La regeneración de las plántulas en el tratamiento donde se expone el tejido solamente a PVS2 y en el tratamiento PVS2+NL+RC+SD fue similar (RP: 60 %), sin diferencias significativas respecto al control. En el tratamiento PVS2+NL, el porcentaje de regeneración disminuyó (RP: 52 %), sin embargo, no fue significativa con respecto al tratamiento PVS2 y al tratamiento PVS2+NL+RC+SD, pero si se encontró diferencia significativa respecto con el control. El crecimiento de las plántulas en el tratamiento PVS2+NL+RC fue nulo, similar al tratamiento con NL. Lo anterior indica que tanto la exposición a NL así como la combinación NL y RC afectan en gran medida el proceso de regeneración de los embriones en estas etapas del protocolo de crioconservación, sin embargo la adición de la SD ayuda a recuperarse del posible daño producido por las etapas anteriores durante el proceso de crioconservación.

El análisis de viabilidad con TTC es implementado para evaluar la viabilidad de semillas (De Souza Grzybowski *et al.*, 2012). Cuando el tejido es viable se desarrolla un compuesto llamado formazán, indicado por un color rojo brillante, debido a la reducción de sales de tetrazolio por la respiración celular en la mitocondria. En cambio, cuando el tejido no es viable no existe la formación de formazán (González-Vera *et al.*, 2019). En este estudio, observamos que la viabilidad de los embriones al utilizar la PVS2 no se vio afectada, pero si por la exposición del tejido a NL y al recalentamiento (PVS2+NL+RC) (Figura 3A). Sin embargo, al utilizar la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD) la viabilidad fue recuperada. Cabe mencionar que los resultados que se obtienen de la

prueba de TTC no son totalmente indicativos de la viabilidad final del tejido, ya que las enzimas encargadas de metabolizar el formazán pueden aún estar activas en células muertas (Nausch y Buyel, 2021), no obstante, este análisis puede ser de gran utilidad como primer acercamiento para discernir entre tejidos con potencial de germinación y regeneración. La prueba de viabilidad más confiable es sin duda la regeneración de los tejidos después del tratamiento (Pinto *et al.*, 2016). Es importante destacar que la prueba de TTC se realizó inmediatamente después de cada uno de los tratamientos, en cambio, la regeneración de los embriones a plántulas se obtiene 15 d después de que el tejido es mantenido en cultivo de tejidos *in vitro* en medio de regeneración, por lo que en este periodo los embriones pudieron tener tiempo para poder recuperarse de alguna alteración debido a los tratamientos de crioconservación.

En el análisis de regeneración de plántulas (Figura 4) los resultados son similares a los que se obtuvieron con el análisis con TTC, donde la viabilidad no se vio afectada de manera significativa con el uso de PVS2, pero si cuando se expone el tejido a NL y al recalentamiento (PVS2+NL+RC). Esto último indica que la exposición a NL y el recalentamiento pueden estar afectando al tejido de manera que generan estrés osmótico por los cambios de temperatura. Además, la viabilidad fue recuperada con el uso de la solución de descarga (PVS2+NL+RC+SD) debido a que los componentes de la solución de descarga ayudaron a disminuir el estrés osmótico que se ocasiona sobre el tejido posterior al recalentamiento (Kaczmarczyk *et al.*, 2012; Da Silva Cordeiro *et al.*, 2020), mejorando la regeneración del tejido. García-Coronado *et al.* (2016) y Lazo-Javalera *et al.* (2018) evaluaron la viabilidad de embriones cigóticos de vid cv. Red Globe crioconservados mediante la regeneración de plántulas reportando un 30 % y 50 % de regeneración respectivamente. En este estudio se logró obtener 60 % de regeneración al final del protocolo de crioconservación. Datos similares (50 - 55 %) fueron reportados por Bettoni *et al.* (2019) en puntas de brote de *Vitis vinifera* crioconservadas. Varios reportes han sido publicados respecto a la germinación y viabilidad en diferentes tejidos de *Vitis vinifera* incluyendo polen, embriones somáticos, puntas de brotes, yemas, embriones somáticos en suspensión y semillas empleando distintas técnicas de crioconservación (Bi *et al.*, 2017). En ellos los porcentajes de viabilidad y germinación oscilan entre 7 y hasta el 100 % dependiendo del procedimiento de crioconservación y tipo de tejido (Bi *et al.*, 2027). Cabe destacar que, aún no se ha descrito un protocolo de crioconservación óptimo para la conservación de embriones cigóticos de vid. En trabajos previos hemos reportado la crioconservación de embriones cigóticos (García-Coronado, *et al.*, 2016; Quijada-Rivera *et al.*, 2022). En este sentido, el porcentaje de regeneración obtenido en este estudio fue mejorado respecto a nuestros estudios previos. Este es el primer trabajo de *Vitis* donde se analiza cada una de las etapas del protocolo de la crioconservación, con la finalidad de identificar cuál de ellas puede estar ocasionado alguna alteración en los tejidos, que puedan afectar la viabilidad y regeneración

con el fin de optimizar la metodología de crioconservación por tiempo prolongado en embriones cigóticos de vid.

## CONCLUSIÓN

Las distintas etapas del protocolo de crioconservación afectaron en grado distinto la viabilidad y la regeneración de los embriones cigóticos de vid, sin embargo, el uso de la solución de descarga es fundamental para disminuir los daños posibles ocasionados a los tejidos debido a las diferentes etapas del protocolo de la crioconservación, mejorando y reestableciendo la regeneración de los tejidos.

## REFERENCIAS

- Bettoni, J. C., Bonnart, R., Shepherd, A., Kretschmar, A. y Volk, G. 2019. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) shoot tips from growth chamber-sourced plants and histological observations. *Vitis*. 58, 71-78. doi:10.5073/vitis.2019.58.71-78.
- Bi W. L., Pan Ch., Hao X. Y., Cui Z. H., Kher M. M., Marković Z., Wang Q. Ch. y Teixeira da Silva J. 2017. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) - a review. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* (2017) 53:449-460 DOI 10.1007/s11627-017-9822-9
- Da Silva Cordeiro, L., Collin, M., Callado, C. H., Simões-Gurgel, C., Albarello, N. y Engelmann, F. 2020. Long-term conservation of *Tarenaya rosea* (Cleomaceae) root cultures: histological and histochemical analyses during cryopreservation using the encapsulation-vitrification technique. *Protoplasma*. 257(4), 1021-1033. doi:10.1007/s00709-020-01486-0.
- De Souza Grzybowski, C., De Castro Ohlson, O., Carvalho da Silva, R. y Panobianco, M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Revista Brasileira de Sementes*. 34(1), 47-54. doi:10.1590/S0101-31222012000100006.
- 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. *Biología Plantarum*. 56(1), 78-82. doi:10.1007/s10535-012-0019-0.
- García-Coronado, H., María-Elena, B.F., Troncoso-Rojas, R., Rivera-Domínguez, M. y Tiznado-Hernández, M. 2016. Cryopreservation by vitrification of *Vitis vinifera* cv. "Red Globe" zygotic embryos and effect on the expression of DNA methyltransferase genes. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. 6. doi:10.17265/2161-6264/2016.06.004.
- González-Arno, M. T., Martínez-Montero, M. E., Cruz-Cruz, C. A. y Engelmann, F. 2014. Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity. In M. R. Ahuja y K. G. Ramawat (Eds.), *Biotechnology and Biodiversity* (129-170pp). Cham: Springer International Publishing.
- González Vera, M. J., Zanatta Aumonde, T., Meneghello, G. E., Noguez Martins, A. B., Aquino, Y. y Peña, P. 2019. Protocolo de análisis de viabilidad de semillas de chíca mediante test de tetrazolio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(7), 1481-1489.
- Kaczmarczyk, A., Funnekotter, B., Menon, A., Phang, P., Al-Hanbali, A., Bunn, E. y Mancera, R. 2012. Current issues in plant cryopreservation. In I. I. Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology*, 417-43. Croacia: IntechOpen. doi: 10.5772/32860.

- Kaity, A., Ashmore, S. E., Drew, R. A. y Dulloo, M. E. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports*. 27(9), 1529-1539. doi:10.1007/s00299-008-0558-1.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Hernández-Oñate, M. A., Martínez-Montero, M. y Rivera-Domínguez, M. 2018. Análisis de la pérdida iónica de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservadas. *Biocercos*. 20(3), 17-22. doi:10.18633/biotecnia.v20i3.706.
- Lazo-Javalera, M. F., Astorga-Cienfuegos, K. R., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Oñate-Hernández, M. A., Martínez-Montero, M. E. y Rivera-Domínguez, M. 2017. Effect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. 'Flame Seedless'. *Investigación y Ciencia*. 1665-4412, 25, 36-44.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M. A., Islas-Osuna, M. A., Oñate-Hernández, M. A. y Rivera-Domínguez, M. 2016. Genetic stability of cryopreserved grapevine (*Vitis vinifera* L.) genome by vitrification method. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. 6, 380-386. doi:10.17265/2161-6264/2016.06.003.
- Lazo-Javalera, M. F., Tiznado-Hernández, M. E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., Rocha-Granados M. C., Martínez-Montero, M. E. y Rivera-Domínguez, M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification. *Data in brief*. 5, 549-555. doi:10.1016/j.dib.2015.10.012.
- Martínez-Montero, M. E., González-Arno, M. T. y Engelmann, F. 2012. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation - Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) Cases. In I. K. Igor (Ed.), *Current Frontiers in Cryopreservation* (Ch. 18, 359-396). Rijeka: IntechOpen. doi: 10.5772/32047.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nausch, H. y Buyel, J. F. 2021. Cryopreservation of plant cell cultures – diverse practices and protocols. *New Biotechnology*. 62, 86-95. doi:10.1016/j.nbt.2021.02.002.
- Normah, M. N., Sulong, N. y Reed, B. M. 2019. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. *Cryobiology*, 87, 1-14.
- Pinto, M. D. S., Paiva, R., Silva, D. P. C. D., Santos, P. A. A., Freitas, R. T. D. y Silva, L. C. 2016. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(4), 380-389.
- Quijada-Rivera, M., Tiznado-Hernández, M. E., Hernández-Oñate, M. A., Vargas-Arispuro, I., Astorga-Cienfuegos, K. R., Lazo-Javalera, M. F. y Rivera-Domínguez, M. 2023. Transcriptome assessment in 'Red Globe' grapevine zygotic embryos during the cooling and warming phase of the cryopreservation procedure. *Cryobiology* 110, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.12.016>.
- Rahmah, S., Ahmad Mubbarakh, S., Soo Ping, K. y Subramaniam, S. 2015. Effects of droplet-vitrification cryopreservation based on physiological and antioxidant enzyme activities of *Brassidium* shooting star orchid. *The Scientific World Journal*. 961793. doi:10.1155/2015/961793.
- Sakai, A., Kobayashi, S. y Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33.
- Souza, F. V. D., Kaya, E., de Jesus Vieira, L., de Souza, E. H., de Oliveira Amorim, V. B., Skogerboe, D., Matsumoto, T., Alves, A. A. C., da Silva Ledo, C. A. y Jenderek, M. M. 2016. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. 124(2), 351-360. doi:10.1007/s11240-015-0899-8.
- Tiznado Hernández M. E., Miranda Jiménez A., Ojeda Contreras A. J., Sánchez Estrada A., Arreola Ortiz H. J. y Martínez Díaz G. 2015. Desarrollo de nuevas variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) sin semilla mediante rescate de embriones. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6 (5), 917-928.
- Ugbede, E. y Hamadina, E. 2018. Dormancy in seeds of hybrid cassava varieties (TMS 98/0505 and TMS 95/0379) prior to hardening of seed Coat. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 8(2), 98-103.
- Villalobos-Olivera, A., Martínez, J., Quintana, N., Zevallos, B. E., Cejas, I., Lorenzo, J. C., González-Olmedo, J. y Martínez-Montero, M. E. 2019. Field performance of micropropagated and cryopreserved shoot tips-derived pineapple plants grown in the field for 14 months. *Acta Physiologia Plantarum*. 41(3), 34. doi:10.1007/s11738-019-2825-x.
- Zakaria, S., Subramaniam, S., Mubbarakh, S. A. y James Antony, J. J. 2020. Effect of encapsulation-dehydration cryopreservation on histological analysis of oncidium golden anniversary orchid PLBs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 596, 012082. doi:10.1088/1755-1315/596/1/012082.