

# ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA IÓNICA DE YEMAS DE VID (*Vitis vinifera* L.) CRIOCONSERVADAS

ION LEAKAGE ANALYSIS IN BUDS OF GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) CRYOPRESERVED

**María Fernanda Lazo-Javalera<sup>1</sup>, Martín Ernesto Tizado-Hernández<sup>2</sup>, Irasema Vargas-Arispuro<sup>1</sup>, Miguel Ángel Martínez-Téllez<sup>2</sup>, María Auxiliadora Islas-Osuna<sup>2</sup>, Miguel Ángel Hernández-Oñate<sup>2</sup>, Marcos Edel Martínez-Montero<sup>3</sup> y Marisela Rivera-Domínguez<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo. Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Carretera La Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora. 83000. México.

<sup>2</sup> Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Carretera La Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora. 83000. México.

<sup>3</sup> Bioplants Center, Plant Breeding Laboratory. University of Ciego de Ávila, Carretera a Moron km 9, CP 69450 Ciego de Ávila, Cuba.

## RESUMEN

La vid es un cultivo importante en México y Sonora es líder en producción. Sin embargo, no existe un método adecuado para la conservación del germoplasma. La criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido (NL)) es una alternativa para la conservación a largo plazo e involucra técnicas de crioprotección (vitricación y encapsulación-deshidratación) para evitar el daño celular durante el congelamiento. En este trabajo se evaluó la pérdida iónica de yemas de vid sometidas a criopreservación mediante vitricación y encapsulación-deshidratación. Para la vitricación las yemas fueron sometidas a PVS2 por 0-180 min. En la encapsulación-deshidratación, las yemas encapsuladas se deshidrataron y se cuantificó la humedad. Finalmente se almacenaron en NL por tres segundos, una hora, un día, una semana y un mes. Se observó que a los 60 min con PVS2 la pérdida iónica fue similar al control. La humedad de las yemas encapsuladas alcanzó un 23 % a las 8 h. La pérdida iónica en las yemas criopreservadas mediante vitricación varió entre 6-23 % y en la encapsulación-deshidratación del 7-30 %. La criopreservación mediante vitricación y encapsulación-deshidratación protegió a las yemas en los tiempos en NL, sin embargo en la vitricación el daño fue menor.

**Palabras clave:** criopreservación, encapsulación-deshidratación, pérdida iónica, PVS2, vitricación.

## ABSTRACT

Grapevine is a major crop in Mexico, and the state of Sonora is the leader in production. However, there is no adequate method of conservation of its germplasm. Cryopreservation (liquid nitrogen storage (NL)) is an alternative for long-term conservation, and involves cryoprotector techniques (vitrification and encapsulation-dehydration) to prevent cell damage during freezing. In this study, the electrolyte leakage of grapevine buds subjected to cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration was evaluated. For the vitrification, the buds were subjected to PVS2 for 0-180 min. In the encapsulation-dehydration the buds were dehydrated and the water content was determi-

ned. Finally, were stored for 3 second, 1 hour, 1 day, 1 week and 1 month in LN. It was observed that 60 min with PVS2 the electrolyte leakage was similar to the control. The water content of the encapsulated buds reached 23 % at 8 h. The electrolyte leakage in the cryopreserved buds by vitrification ranged from 6-23 % and in the encapsulation-dehydration technique from 7-30 %. The cryopreservation by vitrification and dehydration-encapsulation protected the buds to different storage times in LN, however using vitrification technical cell damage was slightly less.

**Keywords:** cryopreservation, electrolyte leakage, encapsulation-dehydration, PVS2, vitrification.

## INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es considerada uno de los cultivos más importantes económicamente en el mundo (Liu et al., 2012). En México se siembran 30 mil 200 hectáreas de uva de mesa, uva pasa y uva industrial y el estado de Sonora es líder en la producción de uva de mesa aportando el 88 % de la producción nacional (SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016). Las variedades más importantes de uva de mesa que se cosechan en Sonora son Flame Seedless, Sugraone, Perlette y Red Globe (AALPUM: Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa, 2016). A pesar de la gran importancia económica de dicho cultivo, a la fecha no hay un método adecuado para la conservación de la especie. Este cultivo se conserva *In Situ* en donde las plantas se mantienen en campo y están expuestas a factores bióticos y abióticos que pueden repercutir en pérdidas del material vegetal. Por ello, es necesario la búsqueda de alternativas más adecuadas para la conservación del germoplasma de vid.

La criopreservación es una alternativa muy eficiente para la conservación a largo plazo del material vegetal, basado en la reducción de las funciones metabólicas a la temperatura del nitrógeno líquido (NL) (-196°C), aunado a que se requiere poco espacio y mantenimiento (Engelmann, 2012). La criopreservación involucra a las técnicas de vitricación y la encapsulación-deshidratación con la finalidad

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

Recibido: 10 de diciembre de 2017

Aceptado: 24 de marzo de 2018

de proteger a las células del daño que pudiera ocasionar la formación de cristales de hielo durante la congelación. Estas técnicas son las más utilizadas en plantas. La vitrificación es el proceso físico en el cual una solución acuosa se solidifica en un estado vítreo estable sin la formación de cristales de hielo cuando la temperatura disminuye durante el congelamiento (Sakai y Engelmann, 2007). La vitrificación de tejidos vegetales emplea soluciones de vitrificación las cuales tienen la función de remover el agua congelable mediante la deshidratación osmótica de los tejidos (Hassan et al., 2013). La solución crioprotectora PVS2 (solución de vitrificación de plantas N° 2, por sus siglas en inglés) es una de las más empleadas en plantas. La encapsulación-deshidratación está basada en de deshidratación osmótica y en la tecnología de formación de semillas artificiales, donde los tejidos son encapsulados con alginato de calcio, deshidratados y congelados rápidamente en NL (Engelmann et al., 2008). En vid se han implementado algunas de éstas técnicas en diferentes tipos de tejidos (Vasanth y Vivier, 2011; Bi et al., 2017). Se ha reportado la encapsulación-deshidratación en suspensiones celulares (Ben-Amar et al., 2013; González-Benito et al., 2009) y en brotes apicales de vid (Bayati et al., 2011; Marković et al., 2013). De igual forma, la vitrificación se ha aplicado satisfactoriamente utilizando la solución crioprotectora PVS2. Matsumoto y Sakai (2003) crioconservaron brotes axilares de *Vitis vinifera* L. cv "Cabernet Sauvignon" utilizando PVS2 obteniendo del 60-80 % de recuperación o regeneración de los tejidos. Zhai et al. (2003) crioconservaron brotes apicales de los cultivares "Cabernet franc", "Chardonnay", "Fengh 51" y "LN33", y reportan en promedio 36 % de regeneración. También actualmente se ha crioconservado mediante vitrificación brotes apicales, yemas axilares y embriones cigóticos utilizando la solución PVS2 (Ganino et al., 2012; Lazo-Javalera et al., 2015; García-Coronado et al., 2016).

Por otro lado, durante el congelamiento y descongelamiento en los tejidos sin protección se produce un incremento del eflujo de iones y solutos orgánicos a través de las membranas celulares. El catión más importante que sale de la célula es el K<sup>+</sup> (Palta et al., 1977; Pukacki y Pukacka, 1987). Palta y Li (1980) demostraron que la alteración específica en el transporte de K<sup>+</sup> se da durante el estrés de congelamiento. Pocos reportes existen relacionados con el daño celular debido a la crioconservación y cuantificado mediante de la pérdida de iones. Martínez-Montero et al. (2002) estudiaron el efecto de la crioconservación en la estructura y la integridad funcional de las membranas celulares de callos de la caña de azúcar mediante la cuantificación de la pérdida de iones, peroxidación lipídica y proteínas de membrana. Verleysen et al. (2004) evaluaron las técnicas de: pérdida iónica, tinción con tetrazolio y concentración de malondialdehído en dos cultivares de azalea crioconservadas, y obtuvieron que la pérdida iónica así como la tinción con tetrazolio fueron eficientes para predecir viabilidad. Posteriormente, Martínez-Montero et al. (2008) compararon tres métodos de crioconservación (vitrificación, encapsulación-vitrificación y micro-goteo) en embriones somáticos de caña de azúcar y evaluaron la

viabilidad de los embriones crioconservados mediante la cuantificación de la pérdida iónica y por regeneración en medio de cultivo. Ellos reportan que la técnica de micro-goteo fue la más eficiente seguido de la encapsulación-vitrificación y la vitrificación fue ineficaz. En la crioconservación de ejes embrionarios de dos árboles (*Acer platanoides* y *A. pseudoplatanus*) observan que durante la deshidratación la integridad de membrana en *A. platanoides* fue poco afectada, mientras que en *A. pseudoplatanus* encontraron un incremento en el rompimiento de membranas; y en ambas especies se obtuvo un daño significativo en el incremento en la pérdida de iones después del almacenamiento en NL, lo cual es indicativo de daño a membranas lo que provoca la pérdida de su semi-permeabilidad y finalmente la muerte celular (Pukacki y Juszczak, 2015). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue cuantificar la pérdida de iones como una medida rápida del daño celular ocasionado por dos procedimientos de crioconservación (encapsulación-deshidratación y vitrificación) en yemas axilares de vid.

## MATERIALES Y MÉTODOS

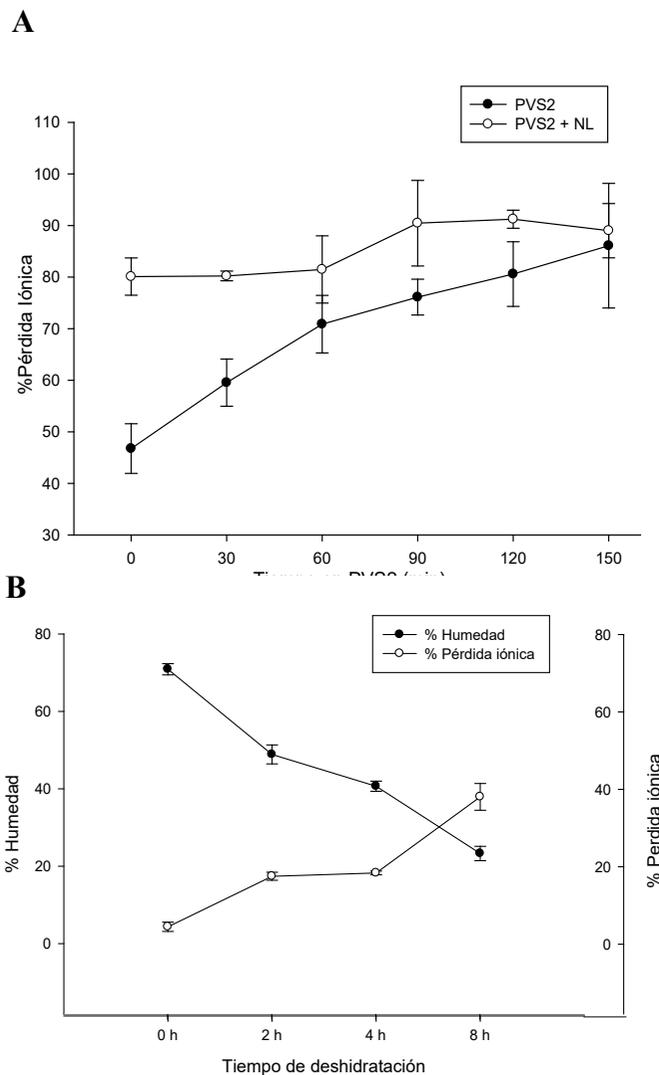
### Material Vegetal

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 yemas se disectaron de las varetas con longitud de 5 a 7 nodos y posteriormente fueron desinfectadas con una solución conteniendo Clorox 20 % con 50 gotas/L de Triton® X-100 y lavadas tres veces con agua destilada estéril (Lazo-Javalera et al., 2016).

### Crioconservación mediante vitrificación

El protocolo de vitrificación se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Matsumoto et al. (1995) con modificaciones. Se utilizaron cinco réplicas por tratamiento con cinco yemas (n=25) por criotubo de 1.5mL con un mL de la solución de vitrificación PVS2 que contiene 30 % glicerol, 15 % etilen glicol, 15 % dimetil sulfóxido y 0.4 M de Sacarosa (Sakai et al., 1990). Para la obtener el tiempo óptimo de exposición con la solución PVS2 las yemas axilares previamente desinfectadas se incubaron en PVS2 a 25 °C durante 0, 30, 60, 90, 120 y 180 min en agitación a 100 rpm; para posteriormente ser almacenadas en NL por una hora, y descongeladas a 38 °C por 3 min en baño maría. Después de cada tiempo de incubación en PVS2 y del almacenamiento en NL se cuantificó el porcentaje de pérdida iónica.

Una vez determinado el tiempo óptimo de exposición de los tejidos en la solución crioprotectora PVS2 (60 min, Fig. 1A) se evaluaron diferentes tiempos de almacenamiento en NL. Las yemas se incubaron en la solución PVS2 por 60 min a 25 °C en agitación a 100 rpm y se colocaron en NL por tres segundos, una hora, un día, una semana y un mes. Posterior a cada tiempo de almacenamiento en NL, los criotubos se descongelaron a 38 °C durante tres minutos en baño maría. Las yemas se lavaron tres veces con agua destilada estéril



**Figura 1.** Optimización del tratamiento de vitrificación y encapsulación-deshidratación. A) Porcentaje de pérdida iónica de yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.) en los diferentes tiempos de vitrificación en PVS2 (puntos negros) y después de una hora en nitrógeno líquido (puntos blancos). B) Porcentaje de pérdida iónica (puntos blancos) y porcentaje de humedad (puntos negros) en yemas encapsuladas-deshidratadas. Las barras verticales en cada punto representan la desviación estándar de la media.

**Figure 1.** Optimization of vitrification and encapsulation-dehydration treatments. A) Percentage of electrolyte leakage in grapevine axillary buds (*Vitis vinifera* L.) at different vitrification times in PVS2 (black spots) and after one hour in liquid nitrogen (white spots). B) Percentage of electrolyte leakage (white spots) and percentage of moisture (black spots) in encapsulated-dehydrated buds. The vertical bars at each point represent the standard deviation of the mean.

para remover la solución crioprotectora y se cuantificó el porcentaje de pérdida iónica. Las yemas control no contienen la solución PVS2, así como el tratamiento de crioconservación (yemas sin crioprotección, sólo congeladas en NL).

### Crioconservación mediante encapsulación-deshidratación

La encapsulación de las yemas se realizó de acuerdo a lo descrito por González-Benito et al. (2009) con modificaciones. Se utilizaron cinco replicas por tratamiento con cinco yemas cada uno (n=25). Las yemas axilares previamente

desinfectadas se encapsularon con alginato de calcio al 2.5 %. Se realizó un pre-cultivo de las yemas encapsuladas en medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) aumentando de concentración de sacarosa diariamente de 0.5, 0.75 y 1 M en agitación a 100 rpm a 25 °C. Para obtener el tiempo óptimo de deshidratación, las yemas encapsuladas se deshidrataron sobre papel filtro estéril en campana de flujo laminar a 25 °C por 0, 2, 4 y 8 h en campana de flujo laminar. Posterior a cada tiempo de deshidratación se cuantificó el porcentaje de pérdida iónica, así como el contenido de humedad con base en peso fresco  $(48 \text{ h a } 100 \text{ }^\circ\text{C})$ , utilizando la siguiente ecuación  $[(\text{peso fresco}-\text{peso seco})/\text{peso fresco}] \times 100$ . Otra parte de las yemas encapsuladas-deshidratadas se colocaron en NL durante una hora, se descongelaron a 38 °C durante 3 min y se cuantificó la pérdida iónica.

Una vez determinado el tiempo óptimo de deshidratación de las yemas encapsuladas (6 h, Fig. 1B) se evaluaron diferentes tiempos de almacenamiento en NL. A las yemas axilares encapsuladas con alginato de calcio al 2.5 % se les realizó un pre-cultivo en medio MS líquido aumentando de concentración de sacarosa diariamente de 0.5, 0.75 y 1 M en agitación a 100 rpm. Posteriormente se deshidrataron sobre papel filtro estéril por 6 h en campana de flujo laminar a 25 °C. Las yemas encapsuladas-deshidratadas se colocaron en NL durante tres segundos, una hora, un día, una semana y un mes. Posterior a cada tiempo de almacenamiento en NL, los criotubos se descongelaron a 38 °C durante tres minutos en baño maría, y se cuantificó el porcentaje de pérdida iónica. Los controles fueron yemas axilares disectadas sin encapsular y sin deshidratar. El tratamiento de crioconservación fue: yemas axilares sin encapsular y sin deshidratar, sólo congeladas en NL.

### Pérdida iónica

La pérdida iónica se determinó antes y después de cada tratamiento de acuerdo a lo reportado por Bajji et al. (2001) con algunas modificaciones. Las yemas después de cada tratamiento se lavaron tres veces con agua desionizada estéril. Se colocaron en tubos y se les agregó agua desionizada estéril (20 mL) y se sometieron a sonicación por 2.5 h más un blanco. Posteriormente se cuantificó la pérdida iónica (C1) de las muestras y del blanco (B1) mediante un conductímetro Cole Palmer Instrument Co., Chicago, Illinois. Finalmente los tubos con las yemas tratadas se colocaron en autoclave por 15 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para obtener así la conductividad total de las muestras (C2) y del blanco (B2). El porcentaje de pérdida iónica se calculó con la siguiente fórmula:  $(C1-B1)/(C2-B2) \times 100$ .

### Análisis estadísticos

Los datos generados en los experimentos se analizaron con un diseño completo al azar y la comparación entre tratamientos se llevó a cabo por el análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer a un nivel de significancia del 95 % utilizando el NCSS (Kaysville, Utah, USA) versión 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Vitrificación

En la figura 1A se muestra el porcentaje de pérdida iónica de yemas axilares de vid después de los diversos tiempos de contacto con la solución PVS2 con y sin NL. En solución crioprotectora, se observa claramente el incremento progresivo del eflujo de iones con respecto al aumento en el tiempo de exposición con la solución PVS2, alcanzándose valores por arriba del 70 % a partir de los 60 min de incubación. Por otro lado, después de una hora de almacenamiento en NL y distintos tiempos en PVS2 se observa que los valores de pérdida iónica se mantienen constantes hasta los 60 min y se eleva el valor hasta un 90 % a los 90 min manteniéndose hasta los 150 min de contacto con la solución, no encontrándose diferencias entre dichos tratamientos. Lo anterior indica que el tiempo de exposición hasta los 60 min con la solución PVS2 fue el más adecuado para su utilización durante el proceso de criconservación para yemas axilares de vid, debido a que es el punto crítico en donde inicia un aumento de la pérdida de iones.

En el presente estudio se obtuvo una tendencia a incrementar el porcentaje de pérdida iónica conforme se aumentó el tiempo de incubación en solución PVS2, debido a la deshidratación que provoca la solución crioprotectora en los tejidos. La exposición directa de los tejidos a la solución PVS2 causa daño nocivo por efecto del estrés osmótico, aunado a que algunos genotipos de vid son sensibles a la deshidratación por efecto de la solución PVS2 (Ganino et al., 2012). Dicho comportamiento ha sido previamente reportado, Shatnawi (2011) evaluó dos soluciones de vitrificación PVS2 y MPVS2 en meristemas de *Capparis spinosa*, de igual forma emplearon diversos tiempos de incubación en ambas soluciones y conforme aumentaban el tiempo de incubación se observó un decremento muy marcado en la regeneración de los tejidos, y al tiempo de 60 min de incubación obtuvieron el máximo de regeneración de los tejidos para ambas soluciones en los tejidos congelados. De igual forma, Sharaf et al. (2012) evaluaron tiempos desde 10 a 90 minutos en PVS2 y observaron viabilidad del 100 % a los 60 min de incubación con la solución crioprotectora. Para el caso del cultivo de vid, Matsumoto y Sakai (2003) emplearon la solución PVS2 y reportan que a los 50 min de exposición son la solución crioprotectora obtuvieron de un 60 a 80 % de recuperación del tejido en *Vitis vinifera* L. cv "Cabernet Sauvignon". Posteriormente, Marković et al. (2013) en *Vitis vinifera* L. cv "Portan" obtuvieron que a mayor exposición con PVS2 se obtuvo menor sobrevivencia y regeneración de los tejidos. A los 25 min obtuvieron un 60 % y a los 75 min con un 30 % de viabilidad, tendencia que observamos en nuestros datos (Fig. 1A), encontrando que para el caso de yemas de vid cv "Flame seedless" el tiempo más adecuado de exposición en solución PVS2 a 25 °C fue de 60 minutos.

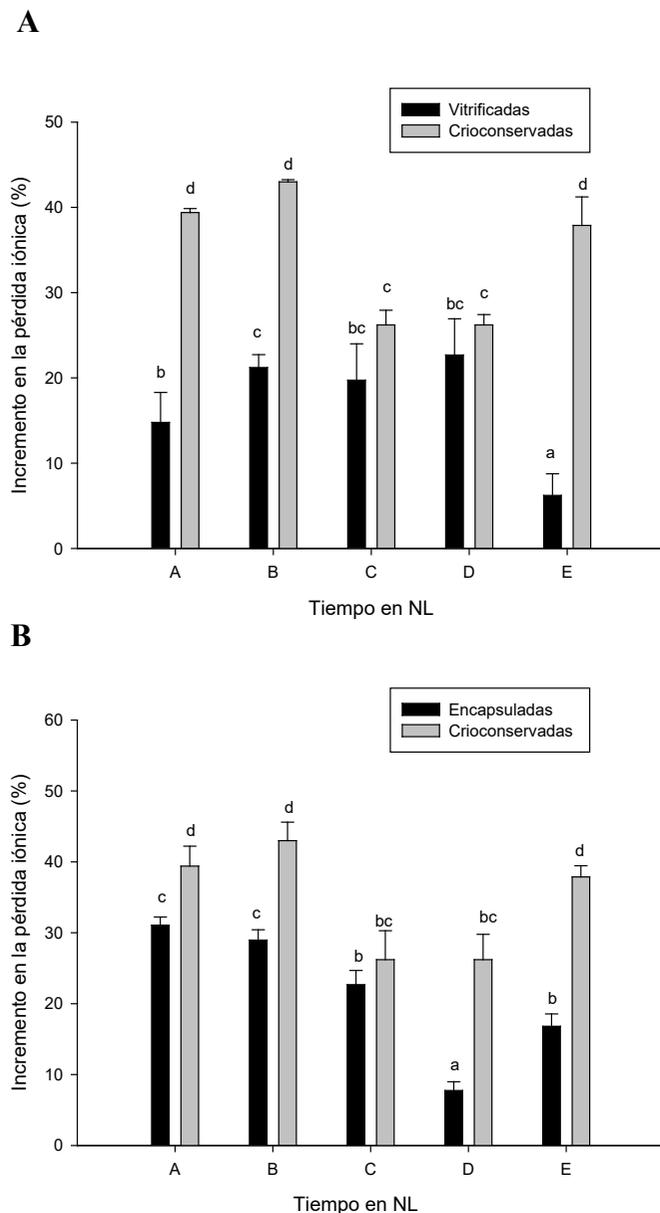
### Encapsulación-deshidratación

En la figura 1B se muestra el contenido de humedad inicial de 70 % con base en peso fresco en yemas encapsu-

ladas-deshidratadas y éste disminuye conforme aumenta el tiempo de deshidratación en campana, alcanzado un 23 % a las ocho horas. Por otra parte, también se observa que conforme disminuye el porcentaje de humedad se incrementa considerablemente la pérdida de iones, aumentando desde 6 % hasta un 40 % a las 8 horas de deshidratación. Se ha reportado que la humedad alrededor del 30 % en los tejidos es adecuada para mantener su viabilidad durante el almacenamiento en NL. Wang et al. (2002) reportaron que la tasa de sobrevivencia en suspensiones celulares de vid es dependiente del contenido de agua y no del método de deshidratación perse. Marković et al. (2013) reportan que un 23 % de humedad los tejidos de vid obtuvieron un 90 % sobrevivencia, y mencionan que a mayor contenido de humedad menor sobrevivencia se obtenía. Por otra parte, varios reportes mencionan que manteniendo el porcentaje de humedad entre el 20 al 30 % se ha obtenido mayor regeneración y/o sobrevivencia de los tejidos (Wang et al., 2002; Shatnawi, 2011, Suzuki et al., 2005). De acuerdo lo anterior, en nuestros resultados el tiempo de deshidratación apropiado durante el procedimiento de encapsulación deshidratación de yemas de vid sería de 6 horas para obtener aproximadamente una pérdida iónica del 30 %.

En la figura 2A, se muestra mayor pérdida iónica en las yemas criconservadas respecto a las yemas vitrificadas mantenidas a distintos tiempos en NL. Se encontró que la solución PVS2 ayuda en gran medida a evitar la pérdida iónica y por consecuencia el daño celular de las yemas vitrificadas-criconservadas comparadas con aquellas sólo congelaron con NL. De igual forma el procedimiento de encapsulación-deshidratación (Fig. 2B) que involucra el pre-cultivo, encapsulación y deshidratación de las yemas, reduce la pérdida iónica comparados con los criconservados (NL), dejando claro el efecto positivo de ambos protocolos (encapsulación y vitrificación) respecto a la pérdida iónica y daño al tejido. El efecto positivo de las metodologías de criconservación en las yemas axilares de vid pudiera deberse a la acumulación de azúcares de los pre-tratamientos y del PVS2 los cuales tienden a disminuir el contenido de agua en las células, lo cual va disminuir la formación de cristales de hielo, principales causantes de los daños a membranas. Por lo tanto, brindará mayor estabilidad a las membranas celulares bajo las condiciones de congelamiento y deshidratación severa (Crowe et al., 1989; Sakai y Engelmann, 2007).

Comparando la eficiencia de las técnicas de encapsulación y vitrificación como protocolos para la criconservación de yemas axilares de vid cv "Flame seedless" en la encapsulación-deshidratación el incremento en la pérdida iónica fue mayor en comparación con la vitrificación (figura 2A y 2B). En las yemas encapsuladas se obtuvo 30 % de incremento máximo en la pérdida de iones a diferencia de la vitrificación con un incremento máximo del 20 %. Dicho comportamiento pudiera deberse a que la encapsulación-deshidratación comprende un procedimiento largo de varios pasos sucesivos (pre-cultivo, encapsulación y deshidratación) y diversas



**Figura 2.** Incremento en el porcentaje de pérdida de iones en yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.). A) Vitrificación y B) Encapsulación-deshidratación. Almacenamiento en nitrógeno líquido por A: tres segundos, B: una hora, C: un día, D: una semana y E: un mes. Las literales indican las diferencias estadísticas de la media de acuerdo a Tukey-Kramer ( $P \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Increase in the percentage of electrolyte leakage in grapevine axillary buds (*Vitis vinifera* L.). A) Vitrification and B) Encapsulation-dehydration. Stored in liquid nitrogen for A: three seconds, B: one hour, C: one day, D: one week and E: one month. The literals indicate the statistical differences of the mean according to Tukey-Kramer ( $P \leq 0.05$ ).

condiciones de manipuleo y estrés a los cuales es sometido el tejido. Debido a esto, es necesario optimizar dichas condiciones para cada tejido tal como lo reportan Marković et al. (2013) donde obtienen en ápices de *V. vinifera* cv "Portan" un 37 % de regeneración mediante encapsulación y con la vitrificación un 50 % de recuperación del tejido. Bajo condiciones optimizadas, el protocolo de vitrificación produce mayores niveles de regeneración después del almacenamiento en NL comparado con la encapsulación-deshidratación (Sakai y

Engelmann, 2007). Los resultados aquí obtenidos muestran el efecto positivo de ambas técnicas de crioconservación, siendo las yemas axilares de vid más susceptibles a la encapsulación-deshidratación respecto a la vitrificación.

## CONCLUSIÓN

Los resultados basados en la pérdida iónica demuestran que la crioconservación de las yemas axilares de vid mediante encapsulación-deshidratación y vitrificación protegió al tejido sometido a los distintos tiempos de almacenamiento en NL, sin embargo la técnica de vitrificación causó menor daño al tejido respecto a la encapsulación-deshidratación.

## 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 a Q.B. Karen Rosalinda Astorga-Cienfuegos por su apoyo técnico y al Ing. Ramiro Domínguez-Martínez por su apoyo técnico en campo para la colecta de las varetas de vid.

## REFERENCIAS

- AALPUM. 2017. Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa. Hermosillo, Sonora, México. Fecha de consulta: Mayo 2017. Recuperado de <http://www.aalpum.com.mx/variedades.htm>
- Bajji, M., Kinet, J.M. y Lutts S. 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 36: 61-70.
- Bayati, S., Shams-Bakhsh, M. y Moini, A. 2011. Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 13: 443-450.
- Ben-Amar, A., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G. y Mliki, A. 2013. Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. *Scientia Horticulturae*. 157: 32-38.
- Bi, W.L., Pan, C., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Kher, M.M., Marković, Z., Wang, Q.C., Teixeira da Silva, J.A. 2017. Cryopreservation of Grapevine (*Vitis* spp.)- a review. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 53: 449-460.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Rudolph, A.S., Wistrom, C.A., Spargo, B.J. y Anchoadoguy, T.J. 1989. Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 947: 367-384.
- 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.
- Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M.T., Wu, W.J., y Escobar, R.E. 2008. Development of encapsulation-dehydration. In: Reed B. M. (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin, pp 59-76.
- 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: 78-82.

- García-Coronado, H., Báez-Flores, M.E., Troncoso-Rojas, R., Rivera-Domínguez, M., Tiznado-Hernández, M.E. 2016. Cryopreservation by vitrification of *Vitis vinifera* L. cv. "Red Globe" zygotic embryos and effect on the expression of DNA methyltransferase genes. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. 6: 387-399.
- González-Benito, M., Martín, C. y Vidal, J. 2009. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the spanish grapevine cultivars "Albariño" and "Tempranillo". *Vitis*. 8: 131-136.
- Hassan N.A., Haggag A.M. 2013. Cryopreservation of two egyptian grape (*Vitis vinifera*) cultivars using two steps vitrification protocol. *World Applied Sciences Journal*. 28: 254-258.
- Lazo-Javalera, M.F., Tiznado-Hernández, M.E., Vargas-Arispuro, I., Valenzuela-Soto, E., Rocha-Granados, M. del C., Martínez-Montero, M.E., Rivera-Domínguez, M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification. *Data in Brief*. 5: 549-555.
- Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M.E., Martínez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A. y Rivera-Domínguez, M. 2016. Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*. 5: 453.
- 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.
- 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: 993-1000.
- Martínez-Montero, M.E., Martínez, J. y Engelmann, F. 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. *CryoLetters*. 29: 229-242.
- Martínez-Montero, M.E., Mora, N., Quiñones, J., González-Arnao, M.T., Engelmann, F. y Lorenzo, J.C. 2002. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. *CryoLetters*. 23: 237-244.
- Matsumoto, T. y Sakai, A. 2003. Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*. 131: 299-304.
- Matsumoto, T., Sakai, A., Takahashi, C. y Yamada, K. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters*. 16: 189-196.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Palta, J.P., Levitt, J. y Stadelmann, E.J. 1977 Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. *Plant Physiology*. 60: 393-397.
- Palta, J.P. y Li, P.H. 1980. Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants. Evidence against rupture theory. *Physiology Plant*. 50: 169-175.
- Pukacki, P. y Juszczak, K. 2015. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryogenic axes of the seeds of two *Acer* species. *Trees*. 29: 285-396.
- Pukacki, P. y Pukacka, S. 1987. Freezing stress and membrane injury of Norway spruce tissues. *Physiology Plant*. 69: 156-160.
- Sakai, A. y Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*. 28: 151-172.
- 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: 30-33.
- Sharaf, S.A., Shibli, R.A., Kasrawi, M.A. y Baghdadi, S.H. 2012. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108: 437-444.
- Shatnawi, M.A. 2011. Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification. *World Applied Sciences Journal*. 15: 318-325.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. Fecha de consulta: Mayo 2017. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx>
- Suzuki, M., Akihama, T. y Ishikawa, M. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83: 115-121.
- Vasanth, K. y Vivier, M.A. 2011. Improved cryopreservation procedure for long term storage of synchronised culture of grapevine. *Biologia Plantarum*. 55: 365-369.
- 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: 11-21.
- Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E. y Perl, A. 2002 Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science*. 162: 551-558.
- 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: 315-322.