

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

*"Enseñar la Explotación de la
Tierra, no la del Hombre"*

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Crioconservación y estabilidad genética de ápices de
plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema
grandiflorum* Kitam.) que acumulan trehalosa**

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito parcial para obtener el título de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA:

ANTELMO OSORIO SAENZ

Chapingo, Edo. de México, mayo de 2010



“Crioconservación y estabilidad genética de ápices de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) que acumulan trehalosa”, tesis realizada por el Ing. Antelmo Osorio Saenz bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR: _____

Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: _____

Dra. María Teresa González Arnao

DEDICATORIA

*A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO Y AL
DEPARTAMENTO DE FOTOFENIA POR HABERME FORMADO
Y APOYADO A LO LARGO DE MI CARRERA PROFESIONAL*

AMIGOS:

CARLOS Y B. M. J. J.

AMIGOS HERMANOS:

ANASTASIA

AMADO

ANTONIA

ISABEL

AMIGOS:

KARLA

CON TODO CARIÑO

AGRADECIMIENTOS.

AL DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO Y A LA DRA. MARIA TERESA GONZALEZ ARNATO POR LA COLABORACIÓN Y ASISTENCIA QUE FUE SOMETIDO ESTE TRABAJO, LO QUE HICIERO POSIBLE MEJORARLO.

AL DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ POR SUS CONSEJOS Y APOYO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA PARTE EXPERIMENTAL Y ELABORACIÓN DE LA TESIS.

A LA M. C. CARMEN POR SU VALIOSA APORTACIÓN EN EL TEMAH DE LA CRIOCONSERVACIÓN, LO CUAL MEJORÓ LA CALIDAD DE ESTE TRABAJO.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, EN ESPECIAL A GISELA POR SU GRAN APOYO PROFESIONAL PARA PODER REALIZAR ESTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS.

AL DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO Y A LA DRA. MARIA TERESA GONZALEZ ARNAO POR LA COLABORACIÓN QUE ME COMETIÓ ESTE TRABAJO, LO QUE ME FUE POSIBLE MEJORARLO.

AL DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ POR SUS CONSEJOS Y APOYO DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA PARTE EXPERIMENTAL Y ELABORACIÓN DE LA TESIS.

A LA M. C. CHAMFÉN POR SU VALIOSA APORTACIÓN EN EL FENÓMENO DE LA CORROSIÓN, LO CUAL MEJORÓ LA CALIDAD DE ESTE TRABAJO.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, EN ESPECIAL A JOSELA POR SU GRAN APOYO PROFESIONAL PARA PODER REALIZAR ESTE TRABAJO.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para poder realizar mis estudios de Maestría.

DATOS BIOGRÁFICOS

Esta tesis fue realizada por el Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia Antelmo Osorio Saenz, originario de Las Palmas, Chicontepec, Veracruz, nacido el 21 de Abril de 1983.

Realizó sus estudios de licenciatura (2002-2007) en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia con la tesis titulada “ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelev) POR CRIOCONSERVACIÓN Y CRECIMIENTO MÍNIMO”.

En enero de 2008 ingresó a la maestría en el Programa de Biotecnología Agrícola (2008-2009) del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Crioconservación y estabilidad genética de ápices de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) que acumulan trehalosa

Cryopreservation of shoot-tips and genetic stability of transgenic chrysanthemum plants (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) that accumulate trehalose

Antelmo Osorio Saenz¹; José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN

Se puede incrementar la acumulación endógena de trehalosa y la tolerancia al congelamiento al sobre expresar los genes de biosíntesis de este azúcar en plantas genéticamente modificadas. Este trabajo muestra la mayor tolerancia a la crioconservación por vitrificación de dos líneas de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) que acumulan trehalosa, en comparación con plantas no transformadas de la misma variedad Indianapolis. Para la crioconservación se extrajeron ápices de plantas cultivadas *in vitro* y se precultivaron por 1-7 días en medio MS con sacarosa 0.3 M, trehalosa 0.3 M o la combinación de ambas (0.15 M c/u), seguido por tratamiento con una solución de sacarosa 0.4 M + glicerol 2 M por 20 min y después expuestos por 0-60 minutos a soluciones de vitrificación PVS2 o PVS3 a temperatura ambiente, para finalmente sumergir los tejidos en nitrógeno líquido. La regeneración más alta después de la crioconservación se obtuvo con el material transgénico precultivado en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M durante 4 días, seguido por el tratamiento en cualquier solución PVS por 40 minutos. Los ápices crioconservados de las dos líneas transgénicas probadas produjeron 63 % y 71 % de regenerantes con PVS3 por 40 minutos, mientras que la no transgénica mostró 45 % de regeneración con PVS3 y 38 % con PVS2 por 40 minutos. De las plantas regenerantes se analizó su estabilidad genética mediante RAPD. No se detectaron *locus* polimórficos en las plantas crioconservadas usando 8 iniciadores con los que se amplificaron un total de 98 loci. Estos resultados muestran que la crioconservación usando vitrificación es genéticamente estable, y que la acumulación endógena de trehalosa en células y tejidos vegetales puede mejorar la tolerancia a la temperatura ultra-baja del nitrógeno líquido.

Palabras clave: Indianápolis, vitrificación, ultra-congelamiento, RAPD.

ABSTRACT

It is possible to increase the endogen accumulation of trehalose and tolerance to freezing by over-expressing biosynthetic genes for this sugar in genetically modified plants. This work shows the higher tolerance to cryopreservation by vitrification of two lines of transgenic chrysanthemum plants (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) that accumulate trehalose, as compared with non-transformed plants from the same variety Indianapolis. For cryopreservation, apices were dissected from plantlets multiplied *in vitro* and precultured for 1-7 days in medium MS with sucrose 0.3 M, trehalose 0.3 M or a combination of both (0.15 M each), followed by a treatment with sucrose 0.4 M + glycerol 2 M for 20 minutes, then exposed for 0-60 minutes to PVS2 or PVS3 vitrification solutions at room temperature; finally, the tissues were submerged in liquid nitrogen. The highest regeneration after cryopreservation was obtained with the transgenic material precultured in sucrose 0.15 M + trehalose 0.15 M for 4 days, followed by a treatment in any PVS solution for 40 minutes. Cryopreserved shoot-tips of both transgenic plants showed up to 63 and 71% regeneration with PVS3 solution, compared with non-transgenic shoot-tips that showed up to 45 and 38 % regeneration with PVS3 or PVS2 solution respectively. Genetic stability of regenerated plants was analyzed with RAPDs. No polymorphic loci were detected in cryopreserved plants by using 8 primers that amplified a total of 98 loci. These results showed that cryopreservation by vitrification is genetically stable and that endogen accumulation of trehalose in plant cells and tissues allows improving tolerance to the ultra low temperature of liquid nitrogen.

Key words: Indianapolis, vitrification, ultra-freezing, RAPD.

¹ Autor de la tesis, requisito para obtener el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo. México.

² Profesor-investigador del Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo, México.

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	5
II. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo General.	8
2.2 Objetivos Específicos.	8
2.3 HIPÓTESIS	8
III. MARCO DE REFERENCIA.....	9
3.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE CRISANTEMO.....	9
3.1.1 Origen, taxonomía y morfología.....	9
3.1.2 Importancia y distribución.	9
3.2 Conservación ex situ	10
3.2.1 Conservación <i>in vitro</i>	11
3.2.1.1 Crioconservación.....	12
3.2.1.1.1 Vitricación.	13
3.2.1.1.2 Crioconservación de crisantemo.....	15
3.3 El disacárido trehalosa	15
3.3.1 Biosíntesis de trehalosa.....	16
3.3.2 Mecanismo de protección de la trehalosa.....	17
3.3.3 Uso de la trehalosa en la crioconservación	20
3.3.3.1 Aplicación en plantas	20
3.3.3.2 Aplicación en mamíferos	20
3.3.4 Manipulación de los genes de trehalosa en plantas	21
3.4 Variación somaclonal in vitro.....	22
3.4.1 Marcadores Moleculares: RAPD.....	24
3.4.1.1 Base molecular de los RAPDs	24
3.4.1.2 Propiedades de los marcadores RAPD.....	25
3.5 Estabilidad genética de plantas crioconservadas	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4. 1 Características del material transgénico (ver apéndice I).....	27
4.2 Procedimientos de crioconservación.....	27
4. 2.1 Protocolo de vitricación.	27
4.2.2 Toma de datos y análisis estadístico.	28
4.3 Estabilidad Genética	28
4.3.1 Purificación de ADN.....	29
4.3.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN.....	30
4.3.2.1 Cuantificación de ADN	30
4.3.3 Obtención de los patrones RAPD	31

4.3.3.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs	32
4.3.3.2 Análisis de datos	33
V. RESULTADOS	34
5.1 Optimización de la duración del precultivo de los ápices: precultivo en sacarosa.....	34
5.1.1 Efecto del tratamiento con las soluciones de vitrificación en la crioconservación de los explantes de crisantemo precultivados en sacarosa.	34
5.1.1.1 Efecto de la deshidratación osmótica con PVS2.....	35
5.1.1.2 Efecto de la deshidratación osmótica con PVS3.....	36
5.2 Efecto de la trehalosa extracelular en precultivo y las soluciones de vitrificación durante el congelamiento	38
5.2.1 Precultivo en trehalosa	38
5.2.2 Efecto crioprotector durante el congelamiento.....	38
5.3 Incremento de la sobrevivencia del material crioconservado mediante el efecto combinado de trehalosa y sacarosa	42
5.3.1 Precultivo en sacarosa en combinación con trehalosa	42
5.3.2 Congelamiento en presencia de trehalosa exógena y endógena	43
5.4 Resumen de resultados de la crioconservación	46
5.5 Estabilidad Genética	47
5.5.1 Plantas crioconservadas.....	47
VI. DISCUSIÓN.....	49
6. 1 Crioconservación de crisantemo no transgénico en precultivo con sacarosa.....	49
6.1.1 Efecto de las soluciones vitrificadoras y la sacarosa en el control....	49
6.1.2 Las plantas transgénicas que acumulan trehalosa durante la crioconservación.....	50
6.2 Superioridad de la trehalosa en medio de precultivo (exógena) en el control	52
6.2.1 Efecto negativo de la aplicación exógena de trehalosa en las plantas transgénicas.	53
6.3 Incremento de la sobrevivencia de las plantas transgénicas mediante el efecto combinado de trehalosa y sacarosa en precultivo.....	54
6.3.1 Transporte de trehalosa.....	56
6. 4 Estabilidad genética de las plantas crioconservadas	58
VII. CONCLUSIONES.....	62
VIII. PERSPECTIVAS	62
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	64
APENDICE I.....	77

Índice de cuadros

Cuadro 1. <i>Uso de los genes de trehalosa en plantas para conferir tolerancia a diversos factores ambientales estresantes.....</i>	<i>21</i>
Cuadro 2. <i>Diseño del muestreo de plantas regeneradas para la estabilidad genética antes de la crioconservación (-NL) y después de la crioconservación (+NL) de las líneas transgénicas y del control.....</i>	<i>29</i>
Cuadro 3. <i>Reactivos empleados en la preparación de amortiguadores.</i>	<i>30</i>
Cuadro 4. <i>Soluciones utilizadas para teñir geles de agarosa.....</i>	<i>31</i>
Cuadro 5. <i>Iniciadores ROTH-B usados para generar marcadores RAPD.....</i>	<i>31</i>
Cuadro 6. <i>Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones RAPDs.....</i>	<i>32</i>
Cuadro 7. <i>Programa térmico de PCR.....</i>	<i>32</i>
Cuadro 8. <i>Efecto de la duración del precultivo en la sobrevivencia de ápices de crisantemo en medio de cultivo con sacarosa 0.3 M.</i>	<i>34</i>
Cuadro 9. <i>Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en sacarosa 0.3 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.....</i>	<i>36</i>
Cuadro 10. <i>Efecto de la duración del precultivo de los ápices en la sobrevivencia en medio de cultivo con trehalosa 0.3 M.</i>	<i>38</i>
Cuadro 11. <i>Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en trehalosa 0.3 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min., deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.</i>	<i>40</i>
Cuadro 12. <i>Efecto de la duración del precultivo de los ápices en la sobrevivencia en medio de cultivo con sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M.</i>	<i>42</i>
Cuadro 13. <i>Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min., deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.....</i>	<i>44</i>
Cuadro 14. <i>Número de loci detectados por cada iniciador generados por RAPD en muestras de ADN crioconservadas y no crioconservadas de crisantemo 'Indianápolis'.</i>	<i>47</i>

Índice de figuras

Figura 1. Vía TPS/TPP u OtsA/OtsB de biosíntesis de trehalosa y la vía de degradación por la trehalasa, produciendo dos moléculas de glucosa.	17
Figura 2. Bicapa lipídica sin trehalosa a temperatura ambiente (a) y a alta temperatura (b), y bicapa lipídica a temperatura ambiente con trehalosa (c) y alta temperatura (d). Las moléculas de agua se han removido para mayor claridad. Los átomos de carbono se presentan en gris, oxígeno en rojo, fósforo en amarillo, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco (tomado de Pereira et al., 2004).....	18
Figura 3. a) Osmoprotección de proteínas por la trehalosa; b) protección de las membranas biológicas durante la deshidratación (tomado de Mascorro-Gallardo et al., 2005).	19
Figura 4. Comparación entre explantes del control, LT1 y LT2 (a) y la comparación entre las soluciones vitrificadoras a los 40 min de exposición (b) provenientes del precultivo en sacarosa y congeladas en NL.	35
Figura 5. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivados en sacarosa 0.3 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.	37
Figura 6. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en sacarosa 0.3, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.	37
Figura 7. Comparación entre el control, LT1 y LT2 (a) y la comparación entre las soluciones vitrificadoras (b).	39
Figura 8. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivados en trehalosa 0.3 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.	41
Figura 9. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en trehalosa 0.3 M, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.	41
Figura 10. Comparación entre el control, LT1 y LT2 (a) y comparación entre las soluciones vitrificadoras (b).	43
Figura 11. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivados en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.	45
Figura 12. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.	45
Figura 13. Comportamiento de las líneas en estudio en cada nivel de precultivo y solución de vitrificación.	46
Figura 14. Patrón RAPD obtenidos en muestras crisantemo del control (1-5), LT1 (6-10) y LT2 (11-15) con iniciador 8 (a); con iniciador 1 (b y c); con iniciador 5 (d).	48
Figura 15. Patrón RAPD obtenidos en muestras crisantemo del control (3 y 4), LT2 (5 y 6) y LT1 (7-9) con iniciador con iniciador ROTH-1 que habían mostrado anomalías en la intensidad de bandas (P, variedad Puma; E, Variedad Eleonora).	48

I. INTRODUCCIÓN

En todos los cultivos es importante conservar las variedades para mantener la variabilidad genética y la producción sustentable de los cultivos en el futuro (Peredo *et al.*, 2008). El crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) es una de las especies ornamentales más importantes a nivel mundial, cultivada por más de 2000 años (Fukai *et al.*, 1991). Con el rápido incremento en la generación de nuevas variedades de crisantemo es necesario implementar métodos de conservación. La mayoría de las técnicas de *cultivo invitro* usadas para guardar el germoplasma son por métodos de almacenamiento en frío y a ultra-bajas temperaturas por requerir de espacios pequeños, costo relativamente bajo y ausencia de problemas externos que frecuentemente afectan la conservación *in situ*. La conservación a ultra bajas temperaturas, crioconservación, es un método de almacenaje a largo plazo que reemplaza el uso rutinario de subcultivos.

Las plantas pueden adaptarse al frío incrementando su tolerancia a través de un proceso llamado aclimatación. Esto puede alcanzarse por la exposición a temperaturas bajas no congelantes por un periodo de tiempo. Cuando las plantas se exponen a estrés por frío, se inducen muchos genes; los productos de estos genes actúan directa e indirectamente contra estreses controlando la expresión de otro conjunto de genes. Estas respuestas llevan a una amplia variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos tales como la acumulación de varios compuestos de bajo peso molecular, conocidos como solutos u osmolitos. Uno de tales compuestos es la trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido), que se sintetiza en muchos organismos como bacterias, levaduras, invertebrados (Elbein, 1974) y en plantas como *Selaginella lepidophylla* (Zentella *et al.*, 1999) y *Myrothamus flabellifolia* (Bianchi *et al.* 1993), ante diferentes condiciones abióticas. Estudios indican que la trehalosa estabiliza proteínas y membranas de la desnaturalización mediante el reemplazo de moléculas de agua, la cuál es necesaria para mantener las propiedades y la estructura terciaria de las proteínas durante la deshidratación (Crowe *et al.*, 1987). Enfocados en las propiedades que presenta la trehalosa, su uso en la crioconservación de plantas se ha reportado mediante la

incorporación exógena en tabaco y zanahoria (Bhandal *et al.*, 1985), incrementado la sobrevivencia después del congelamiento. Con el descubrimiento de las vías de biosíntesis de trehalosa (Goddijn y van Dun 1999), se han desarrollado estrategias para manipular genéticamente los genes de trehalosa. La biosíntesis de trehalosa en *Arabidopsis* incrementa la tolerancia al frío (Miranda *et al.*, 2007) aún a niveles bajos de trehalosa. Por eso, se ha sugerido que la trehalosa no mejora la tolerancia al estrés en plantas transgénicas, sino su efecto ó el intermediario T6P en la señalización de azúcares y la expresión de genes relacionados al estrés (Bae *et al.*, 2005; Ramón *et al.*, 2007). En levaduras se ha mostrado que para la estabilización de las membranas se requiere que la trehalosa se encuentre en ambos lados (Crowe y Crowe, 2000), lograda por el transporte de trehalosa al interior de célula.

Aunque el material biológico puede ser crioconservado teóricamente sin alteraciones genéticas a ultra baja temperatura, muchos estreses se pueden generar asociados con los procesos de crioconservación (Kaity *et al.*, 2008). Sin embargo, con el mejoramiento y optimización de los procedimientos de crioconservación aumentaron las evidencias que muestran que la estabilidad molecular se mantiene durante el periodo de crioconservación (Hitmi *et al.*, 2000). Trabajos previos en la estabilidad genética de crisantemo crioconservado, Martín y González-Benito (2005), detectaron variación somaclonal usando marcadores RAPD. Fukai y Oe (1990) mostraron que el DMSO causa anormalidades en el desarrollo de la hoja.

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la trehalosa endógena y exógena para ápices de crisantemo transgénicas mediante la técnica de vitrificación y evaluar la estabilidad genética de las plantas crioconservadas.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General.

Evaluar el papel que juega la trehalosa intracelular y extracelularmente en la protección durante la crioconservación de crisantemo var. Indianápolis.

2.2 Objetivos Específicos.

1. Optimizar las condiciones de crioconservación de ápices de crisantemo mediante el procedimiento de vitrificación y ensayando dos soluciones vitrificadoras (PVS2 y PVS3).
2. Seleccionar dos líneas de plantas transgénicas introducidas *in vitro* y obtenidas con la construcción quimérica 35S::ScTPS1-TPS2::NOS que sintetizan trehalosa endógenamente, para evaluar la tolerancia al congelamiento en nitrógeno líquido.
3. Estudiar el efecto de la aplicación exógena de trehalosa en la crioconservación de ápices de plantas *in vitro* procedentes de líneas transgénicas y no transgénicas.
4. Evaluar el efecto combinado de sacarosa y trehalosa en forma exógena en la tolerancia al congelamiento de los ápices.
5. Verificar la estabilidad genética por ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) de las plantas recuperadas después de la crioconservación.

2.3 HIPÓTESIS

La síntesis y acumulación trehalosa endógena en las plantas transformadas de crisantemo con la construcción quimérica 35S::ScTPS1-TPS2::NOS les conferirá tolerancia al congelamiento por su capacidad de proteger la estructura y función de membranas y proteínas.

La combinación de trehalosa y sacarosa aplicada exógenamente mejorará la tolerancia del material biológico no transgénico debido a una mayor internalización de trehalosa, tal vez a través de transportadores de baja afinidad de sacarosa.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE CRISANTEMO.

3.1.1 Origen, taxonomía y morfología

El crisantemo, (*Dendranthema x grandiflora* Tzvelev) es una planta originaria de Asia Oriental, pertenece a la familia de especies tetraploides de *D. indicum* var. Procumbens (Lour.), nativo de Norte de China x una especie diploide de *D. zawadskii* var. Latilobum (Maxim.), nativa de China Central, aunque el verdadero origen aún no está claro (Fukai *et. al.*, 2000). El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo, y la mayoría de las especies de donde se han generado los nuevos cultivares son igualmente originarias de China (Fukai, 2003).

El crisantemo pertenece a la familia Asteraceae, las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Lo que se conoce como flor, es realmente una inflorescencia en capítulo. Existen diversos tipos de capítulo cultivados comercialmente, aunque, en general, ésta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas (radiales; se corresponden con la hilera exterior en las margaritas) y hermafroditas (concéntricas; se corresponden con las centrales). El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas (Fukai, 2003).

3.1.2 Importancia y distribución.

El crisantemo es una de las especies ornamentales de mayor importancia a nivel mundial como flor de corte y para maceta. Su valor ornamental es apreciado por la gran diversidad en formas y colores de las flores. Los cultivares comerciales son propagados vegetativamente. Esta flor, es culturalmente rica, y mundialmente, es el segundo cultivo florícola de mayor importancia económica, sólo por debajo de la rosa. La producción del

crisantemo se incrementó exponencialmente como resultado del mejoramiento del cultivo (Teixeira da Silva, 2003), además de que es importante en varios países europeos, como Holanda, Gran Bretaña y Francia; de América como Colombia, Estados Unidos y Canadá, donde desde hace mucho tiempo es un cultivo industrializado. En Japón, la flor de crisantemo tiene un valor simbólico.

En México, la gran diversidad de climas y la riqueza de suelos, permiten obtener una amplia gama de flores. El Estado de México es la principal entidad productora de flores en el país. Dentro de la zona de influencia de Chapingo (Texcoco, San Miguel Tlaixpan, Tequexquinahuac, Santa Catarina del Monte, Boyeros y San Pablo Izayoc) la variedad Indianápolis tiene una demanda alta (SAGARPA, 2005; 2006). No obstante, esta variedad ha disminuido la superficie cultivada porque de acuerdo a los floricultores de la zona, es muy susceptible al frío, lo cual puede disminuir la calidad de la flor.

3.2 Conservación ex situ

Las tendencias actuales de la industria florícola están enfocadas a la producción segura en sistemas de producción amigables con la naturaleza. La conservación *ex situ* es una alternativa para la conservación de los recursos genéticos fuera del hábitat nativo, al cual se recurre generalmente para salvaguardar las poblaciones en peligro de extinción (Rao, 2004), reubicándolos bajo condiciones apropiadas para su almacenamiento a largo plazo (Benson, 1999).

A este tipo de conservación se le ha asociado varios componentes: la exploración, colección, establecimiento del banco, distribución, documentación y su evaluación. Posteriormente, el material debe ser reproducido para aumentar y mejorar el cultivo, completando de esta manera el ciclo (Benson, 1999). Las muestras mantenidos *ex situ* pueden ser conservadas en los bancos de germoplasma, centros de investigación, jardines botánicos y arbóreos (Benson, 1999). Actualmente, el almacenamiento de ADN y de polen también son opciones en la conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos (Rao, 2004).

La biotecnología puede posibilitar directa e indirectamente las estrategias de conservación, ya que al mismo tiempo permite utilizar y proteger especies que son importantes económicamente, factor fundamental para las áreas ricas en biodiversidad, y de gran impacto en las generaciones futuras (Benson, 1999). Los avances en el área de cultivo *in vitro* y biología molecular provee algunas herramientas importantes para mejorar la conservación y manejo de los recursos filogenéticos (Benson, 1999).

3.2.1 Conservación *in vitro*.

Los primeros reportes de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tuvieron lugar en los años 1930-40, época en la que se consideraba como una nueva tecnología basada en la manipulación de material vivo. A partir de aquí, esta tecnología se ha desarrollado considerablemente y hoy en día juega un papel clave en el mejoramiento y apoyo fundamental para la ingeniería genética (White, 1943).

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos son de gran interés para la colección, almacenaje y multiplicación de especies que producen semillas recalcitrantes y las que se propagan vegetativamente (Engelmann, 1991), así como de materiales modificados genéticamente (Kantha, 1987). Facilita ampliamente el intercambio de germoplasma a nivel internacional. De hecho, el tamaño de las muestras es drásticamente reducido y puede ser expedido en condiciones estériles.

El almacenamiento *in vitro* de un gran volumen de material por la práctica del cultivo de tejidos conduce a varios problemas: dificultades en el manejo del material vegetal en el laboratorio (principalmente por los subcultivos frecuentes que se hacen con regularidad) y riesgo de variación genética (aspecto que se incrementa a medida que aumenta la duración del almacenaje *in vitro*). Por lo tanto, puede ocurrir la pérdida de una especie en particular o de las características útiles de las plantas (Engelmann, 1991).

Los métodos de almacenamiento *in vitro* son diferentes, dependiendo de la duración del almacenaje requerido. Éstos son de gran utilidad, especialmente para aquellas especies que producen semillas recalcitrantes y/o que se propagan vegetativamente, aunque recientemente, también se han aplicado para material genéticamente modificado o que proviene de los programas de mejoramiento. Los métodos de conservación *in vitro* están clasificados en dos grupos: i) procedimientos de crecimiento lento. Su uso es para un almacenaje a corto o mediano plazo, guardando accesiones de germoplasma como tejidos vegetales estériles de plántulas en ciertas condiciones de cultivo (Rao, 2004), cuyo objetivo es reducir el crecimiento e incrementar los intervalos entre un subcultivo y otro (Engelmann, 1991); ii) crioconservación. Esta técnica se emplea para un almacenamiento a largo plazo, conservando el material a temperaturas ultra bajas. En esta condición, el material puede estar almacenado sin modificaciones por periodos prolongados de tiempo, en espacios reducidos y poco requerimiento en mantenimiento (Engelmann, 1997a).

3.2.1.1 Crioconservación.

La crioconservación es un conjunto de técnicas que contemplan el almacenaje de material biológico a temperaturas ultra bajas, preferiblemente a la temperatura del nitrógeno líquido, -196 °C. A esta temperatura, las divisiones celulares y las actividades metabólicas permanecen suspendidas y el material puede estar almacenado sin cambios por periodos teóricamente ilimitados de tiempo (Benson, 1999; Panis *et al.*, 2001; Rao, 2004; Engelmann, 2004; González-Arno y Engelmann, 2006).

De acuerdo a Reinhoud *et al.* (2000), los primeros acontecimientos exitosos de la crioconservación en plantas fueron reportados por Quatrano (1968) y Street (1973). Inicialmente, la crioconservación comenzó a aplicarse en especies cultivadas, y recientemente, en la conservación de especies que se encuentran en peligro de extinción y en árboles tropicales y forestales. Se asume que esta técnica es práctica y segura por requerir de espacios pequeños, el material almacenado queda protegido de la contaminación y, las

necesidades de mantenimiento son muy pocas, por lo tanto, representa una opción de almacenaje a largo plazo (Rao, 2004) cuando ya se ha establecido eficientemente las condiciones óptimas para la crioconservación.

Se han conservado diferentes materiales con características específicas como suspensión de células, protoplastos, callos, polen, embriones (somáticos y cigóticos) y ápices (Engelmann, 1991; Sangwan-Norreel *et al.*, 1991; Niino *et al.*, 2000; Takagi, 2000; Rao, 2004). También tejidos con propiedades medicinales y productoras de alcaloides (Panis y Lambardi, 2005). Aún con los recientes progresos en los estudios criobiológicos de material vegetal, la crioconservación de plantas no tolerantes al frío, especialmente las tropicales, ha sido menos investigada a causa de que este material muestra una mayor sensibilidad a las bajas temperaturas y a la desecación (Takagi, 2000).

Los primeros trabajos experimentales en el campo de la criobiología datan de mediados del siglo XIX, pero en realidad, las investigaciones relacionadas con los mecanismos de daño del congelamiento en los sistemas biológicos comenzó hasta el segundo cuarto del siglo XX, a través de los esfuerzos de Luyet, Lovelock y Mazur (Meryman y Williams, 1985). Los primeros trabajos fueron hechos en células animales, y de acuerdo a la similitud en el mecanismo que siguen los daños del congelamiento y la tolerancia a ésta, los principios de crioconservación se aplican de forma general tanto en células animales como en vegetales (Meryman y Williams, 1985).

3.2.1.1.1 Vitricación.

En 1985, Rall y Fahy reportaron la crioconservación de embriones de ratón por medio de soluciones vitrificadoras altamente concentradas (Reinhoud *et al.*, 2000; Panis *et al.*, 2001). Años después, la técnica de vitricación fue adoptada para cultivo de tejidos vegetales utilizando suspensión de células, protoplastos, embriones somáticos y meristemos de varias especies (Towill, 1985; Langis *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 1990). Actualmente, el protocolo se ha aplicado a tejidos vegetales de más de 50 especies, considerándose como el protocolo de crioconservación vegetal de mayor aplicación (Panis *et al.*, 2001).

El principio del método de vitrificación es una deshidratación del material biológico por la exposición a una solución de vitrificación de alto potencial osmótico (Takagi, 2000).

Básicamente, el protocolo implica las siguientes etapas: (Engelmann, 1997b; Takagi, 2000; Engelmann, 1991; Panis *et. al.*, 2001):

1. Preparación y selección del explante. La etapa fisiológica de los explantes puede influenciar en el potencial de sobrevivencia (Engelmann, 1997b).

2. Pre-cultivo. Los explantes recién disectados se tratan en un medio semisólido con sacarosa, de 0.3-0.6 M. En muchos casos, el material vegetal es sometido a varios tratamientos adicionales antes de la crioconservación (Engelmann, 1997b; Takagi, 2000; Engelmann, 1991; Panis *et. al.*, 2001).

3. Tratamiento de carga. La carga consiste del tratamiento de los explantes en medio líquido, conteniendo sustancias crioprotectoras (sacarosa, glicerol, etilen glicol) por un corto periodo de tiempo, que varía entre 5 a 90 minutos, dependiendo del material (Takagi, 2000).

4. Deshidratación osmótica. Se realiza mediante una exposición de los explantes a una solución de vitrificación para plantas (PVS's) a 0 o 25 °C por 5 minutos o superiores a las 7 horas. Las soluciones vitrificadoras son mezclas complejas de crioprotectores, formulados para aumentar la capacidad de vitrificar, esto es, formar una estructura de sólido amorfo. La mayoría de las soluciones utilizadas se derivan de las elaboradas por dos grupos: el de Sakai (Sakai *et. al.*, 1990) y el del grupo de Steponkus (Langis *et. al.*, 1989).

5. Congelamiento. Los explantes contenidos en crioviales se enfrían rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido, con el objetivo de lograr la vitrificación del contenido intracelular.

6. Descongelamiento. El descongelamiento de los explantes se realiza tan rápido como sea posible para evitar la de-vitrificación, que puede llevar a la formación nociva de cristales de hielo, que afecta la integridad celular (Meryman y Williams, 1985). Las muestras se sumergen en baño de agua o medio líquido a +20 - +40 °C (Engelmann, 1997b; Takagi, 2000; Engelmann, 1991; Panis *et. al.*, 2001).

7. Remoción de la solución de vitrificación. El objetivo es remover progresivamente la solución vitrificadora, para reducir un posible choque osmótico. Para esto se usa el medio líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa o sorbitol, que se agrega progresivamente para diluir la solución de vitrificación (Engelmann, 1997b; Takagi, 2000; Engelmann, 1991; Panis *et. al.*, 2001).

8. Finalmente, el material se transfiere a condiciones de recuperación sobre el medio de cultivo y se mantiene la primera semana en la oscuridad para evitar la fotooxidación.

3.2.1.1.2 Crioconservación de crisantemo.

El almacenamiento y conservación de los recursos genéticos de crisantemo mediante semillas ha sido logrado mediante cuartos a temperaturas de conservación (20-40 °C), técnicas de crecimiento lento usando retardadores del crecimiento (Roxas *et. al.*, 1995; Rajapakse *et. al.*, 1996) y técnicas criogénicas clásicas y modernas. La crioconservación de crisantemo se ha logrado con ápices, yemas y callos. La crioconservación de ápices se ha reportado por Fukai (1990); Fukai y Oe (1990); Fukai *et. al.*, (1991, 1994); Ahn y Sakai (1994); Hitmi *et. al.*, (1997; 1999; 2000); Niino *et al.*, (2000); Halmagyi *et. al.*, (2004), y por Martín y González-Benito (2005; 2009). Mediante yemas axilares por Hee (1995) y en el caso de callos, solo ha sido reportado por Hitmi *et. al.*, (1997).

3.3 El disacárido trehalosa

La trehalosa (α -D—glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranósido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa, sintetizada por todos los organismos excepto por los animales vertebrados. Fue identificada inicialmente como un azúcar desconocido en el hongo del cornezuelo del centeno en 1832 (Crowe *et al.*, 1998). El nombre de trehalosa fue introducido en 1858 cuando se encontró en las secreciones de los capullos de los escarabajos del desierto del Medio Oeste, *Larinus nidificans* y *L. maculatus*, cuyo nombre común era “trehala”. Estas secreciones, eran conocidas por gentes nativas por ser comestibles y dulces, por lo que fueron llamadas “trehala

maná” (Crowe *et al.*, 1998). La trehalosa siempre ha sido parte de la dieta en los humanos como un componente de hongos comestibles, crustáceos marinos, levaduras del pan y la cerveza. Este azúcar ha sido reconocido por su habilidad protectora, por su estabilidad y baja reactividad. La trehalosa enmascara sabores y olores desagradables y tiene su propio sabor dulce, siendo aproximadamente la mitad de dulce que la sacarosa; por esta última razón, la trehalosa es un ingrediente importante en productos alimenticios y bebidas como un estabilizador y preservador de productos frescos (Schiraldi *et al.*, 2002). También puede usarse como un crioprotector de células, tejidos y órganos animales y vegetales.

3.3.1 Biosíntesis de trehalosa

Las plantas son las únicas que sintetizan trehalosa y sacarosa; sin embargo, la sacarosa tiene la función principal de traslocarse en las plantas. La síntesis de trehalosa puede ocurrir de cinco rutas en la naturaleza. Solo una de ellas, la vía OtsA-OtsB (o TPS/TPP), produce el intermediario trehalosa-6-fosfato, que al parecer es fundamental en las plantas (Eastmond *et al.*, 2002). Esta vía es la más distribuida y se encuentra en todos los organismos procariontes y eucariontes que sintetizan la trehalosa y es la única vía detectada en las plantas. La ruta OtsA-OtsB, involucra la participación de la enzima TPS que cataliza la transferencia de una molécula de glucosa de la uridina difosfato glucosa (UDPG) a glucosa-6-fosfato (G6P) para formar trehalosa-6-fosfato (T6P) y uridín difosfato (UDP). Posteriormente la enzima trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) desfosforila a la T6P para formar trehalosa y fosfato inorgánico (Bell *et al.*, 1998) (Figura 1).

La falta de reportes en la mayoría de las plantas, llevó al supuesto de que la trehalosa era de relevancia mínima. La primera publicación sobre la posible existencia de la vía de biosíntesis de trehalosa en las plantas se dio cuando se aisló el gen AtTPS1 de *Arabidopsis thaliana* mediante complementación funcional de la mutante *tps1* de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* (Blázquez *et al.*, 1998).

Tiempo después se encontró, analizando el genoma de *Arabidopsis*, toda una familia de genes codificantes de *TPSs* y otra para *TPPs* (Goddijn y van Dun, 1999; Leyman *et al.*, 2001).

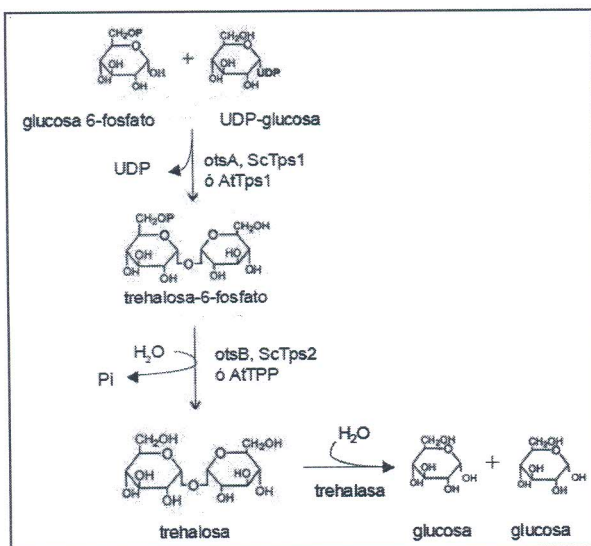


Figura 1. Vía TPS/TPP u OtsA/OtsB de biosíntesis de trehalosa y la vía de degradación por la trehalasa, produciendo dos moléculas de glucosa.

La degradación de la trehalosa se lleva a cabo por la trehalasa, que origina dos moléculas de glucosa (Figura 1). Se ha propuesto que las funciones principales de la biosíntesis de trehalosa es proteger contra condiciones ambientales estresantes (Sano *et al.*, 1999) y la regulación del metabolismo (Paul *et al.*, 2007), no para actuar como una reserva de carbohidratos.

3.3.2 Mecanismo de protección de la trehalosa

Los disacáridos como la sacarosa y trehalosa se han usado ampliamente como crioprotectores naturales (Patist y Zoerb, 2005). Muchos organismos como tardígrados (*Echiniscus blumi*, *Artemia salina*), semillas, bacterias, levaduras y plantas (*Selaginella lepidophylla*, *Myrothamus flabillifolius*, *Sporobolus atrovirens*) (Crowe *et al.*, 1992; Iturriaga *et al.*, 2000) pueden sobrevivir en estado inerte, deshidratados por periodos prolongados de tiempo, con una pérdida de agua alrededor del 99 %, un fenómeno conocido como anhidrobiosis (Crowe *et al.*, 1997). Éstos organismos tienen en común sintetizar grandes cantidades de trehalosa (Crowe y Crowe, 2000), que en algunos casos puede llegar a representar el 20 % del peso seco. Son capaces de soportar condiciones extremas de altas temperaturas, salinidad y radiación, recuperando sus funciones vitales en cuanto se rehidratan de nuevo (Crowe *et al.*, 1992).

La trehalosa es conocida por sus propiedades bioprotectoras. Juega un papel de protección estabilizando bioestructuras tales como proteínas y membranas lipídicas. Es capaz de minimizar el efecto de ruptura a elevadas temperaturas y estabilizar la estructura de la bicapa. Interactúa directamente con la bicapa a través de puentes de hidrógeno. Sin embargo, las moléculas de agua en la superficie de la bicapa no son reemplazados completamente. A alta temperatura, el efecto protector de la trehalosa esta correlacionado con un incremento significativo en el número de puentes de hidrógeno trehalosa-bicapa, mediante un incremento en el número de moléculas de trehalosa por cada tres o más moléculas de lípidos (Pereira *et al.*, 2004) (Figura 2).

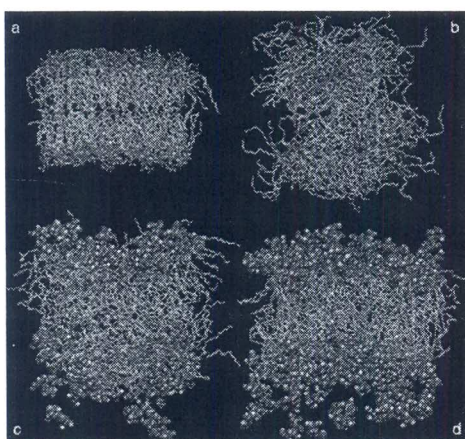


Figura 2. Bicapa lipídica sin trehalosa a temperatura ambiente (a) y a alta temperatura (b), y bicapa lipídica a temperatura ambiente con trehalosa (c) y alta temperatura (d). Las moléculas de agua se han removido para mayor claridad. Los átomos de carbono se presentan en gris, oxígeno en rojo, fósforo en amarillo, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco (tomado de Pereira *et al.*, 2004).

Éste disacárido protege proteínas y membranas de la desnaturalización mediante el reemplazo de moléculas de agua, la cuál es necesaria para mantener las propiedades y la estructura terciaria de las proteínas durante la deshidratación (Crowe *et al.*, 1987).

De acuerdo con la “hipótesis de reemplazamiento del agua” (Crowe *et al.*, 1987), los grupos hidroxilo de la trehalosa se unen a las cabezas polares de los fosfolípidos de la bicapa lipídica en lugar del agua. Durante la desecación forma una estructura cristalina amorfa que limita el movimiento molecular, evitando la agregación de proteínas y difusión de radicales libres (Figura 3). Cuando la membrana celular se encuentra deshidratada, existe un incremento en la temperatura de transición de gel a cristal líquido (T_m). La unión de la trehalosa a la superficie de la membrana, baja la T_m en comparación con membranas hidratadas completamente.

Por esta razón, las membranas en estado deshidratado no están bajo una fase de transición durante la rehidratación, evitando así la ruptura de contenidos celulares (Oliver *et al.*, 1998).

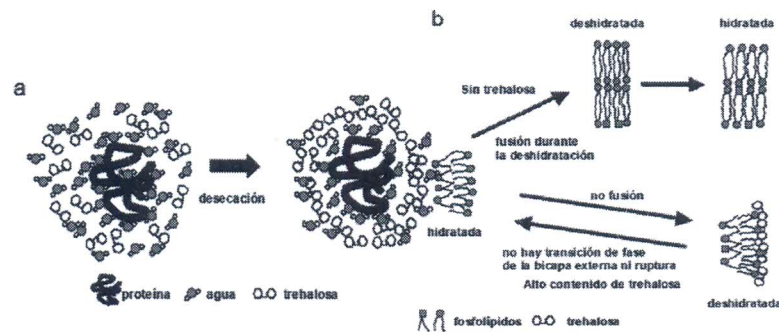


Figura 3. a) Osmoprotección de proteínas por la trehalosa; b) protección de las membranas biológicas durante la deshidratación (tomado de Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

En levaduras, el modo de protección de la trehalosa es de una forma dual; actúa disminuyendo drásticamente el agua, manteniendo la viabilidad de las células deshidratadas y, también actúa como un agente de estructuración de agua durante la rehidratación (Sano *et al.*, 1999).

Aunque la trehalosa juega un papel importante en la tolerancia a la deshidratación excesiva, es posible que otros factores contribuyan a la estabilidad celular en organismos anhidrobiontes. Por ejemplo, embriones de *Artemia franciscana*, que soportan la ausencia virtual de todo el contenido de agua celular, contienen, en adición a la trehalosa, grandes cantidades de proteínas "Heat-shock", llamadas P26. Ésta proteína actúa como una chaperona molecular *in vitro*, y probablemente *in vivo*, y se ha observado que trabaja junto con la trehalosa en inhibir el daño oxidativo (Clegg y Drost-Hansen, 1990).

3.3.3 Uso de la trehalosa en la crioconservación

3.3.3.1 Aplicación en plantas

La utilidad de la trehalosa como crioprotector ha sido demostrada en la sobrevivencia de muchos organismos y estructuras biológicas, principalmente en mamíferos (Eroglu *et al.*, 2000). En plantas, su uso ha sido aplicado en *Digitalis lanata* (Göldner *et al.*, 1991), en tabaco y zanahoria (Bandhal *et al.*, 1985), *Arabidopsis* (Bachiri *et al.*, 2001), en *Taxus chinensis* (Sanglic *et al.*, 2001), en la leguminosa *Parkia speciosa* (Nadajaran *et al.*, 2008), y a protoplastos de musgo (*Pogonatum* y *Polytrichum*) (Yamazaki *et al.*, 2008), mostrando incrementos en la sobrevivencia del material crioconservado. La crioconservación de estas especies vegetales se ha hecho mediante la incorporación exógena del disacárido, mediante el precultivo del material biológico. Lo más parecido que se ha estudiado a bajas temperaturas es hasta los -10 °C (Suárez *et al.*, 2009; Cheol *et al.*, 2003; Garg *et al.*, 2002), pero no hasta la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C).

3.3.3.2 Aplicación en mamíferos

En mamíferos, la aplicación potencial de disacáridos intracelulares en la conservación de células es limitada, por la incapacidad de las células para sintetizar o acumular activamente azúcares como la trehalosa, a menos que se encuentren presentes proteínas específicas en la membrana celular para facilitar el transporte. Se han desarrollado varios métodos experimentales para incorporar azúcares no nativos como la trehalosa dentro de las células de mamíferos, como la de poros artificiales, poración termal, modificación genética, microinyección, poración con receptores P₂X₇, electroporación y permeabilización por pulsos de laser de alta intensidad (Elliot *et al.*, 2006). Recientemente, se ha encontrado un transportador de trehalosa del anhidrobionte *Polypedilum vandepeyanli*, conocido como TRET1 (Kikawada *et al.*, 2007).

Guo *et al.* (2000) y Puhlev *et al.* (2001), han expresado genes que codifican para trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa de *E. coli* en fibroblastos humanos, resultando en un incremento en la tolerancia a deshidratación en éstas células. Es notable que en este caso la sobrevivencia se logró en ausencia de agua y a temperatura ambiente.

3.3.4 Manipulación de los genes de trehalosa en plantas

La transformación genética con los genes involucrados en la síntesis de trehalosa, ha permitido mejorar la tolerancia al estrés abiótico en diferentes especies de plantas (Cuadro 1). El principal factor de estrés en la que se han enfocado la mayoría de los cultivos transgénicos ha sido la sequía, siendo el frío uno de los que menos se ha estudiado.

Cuadro 1. Uso de los genes de trehalosa en plantas para conferir tolerancia a diversos factores ambientales estresantes

Promotor	Plant a	Tipo de estrés	Fuente
CaMV35S	Trigo	Sequía	Chun <i>et al.</i> , 2009
CaMV35S, rd29A	Alfalfa	Sequía, salinidad, calor y frío	Suárez <i>et al.</i> , 2009
StDS2	Papa	Sequía	Stiller <i>et al.</i> , 2008
CaMV35S, rd29A	Arabidopsis	Sequía, salinidad, calor y frío	Miranda <i>et al.</i> , 2007
AtRbcS1A, AtRAB18	Tabaco, Arabidopsis	Sequía	Karim <i>et al.</i> , 2007
CaMV35S	Maíz	Sequía	Almeida <i>et al.</i> , 2007
CaMV35S	Trigo	Sequía y salinidad	Du <i>et al.</i> , 2007
CaMV35S	Tomate	Sequía, salinidad, oxidación	Cortina y Culiáñez-Maciá, 2005
Ubi1	Arroz	Sequía, salinidad y frío	Cheol <i>et al.</i> , 2003
CaMV35S	Arroz	oxidación, salinidad, sequía y frío	Garg <i>et al.</i> , 2002

La mayoría de los genes de trehalosa en los cultivos mostrados en el cuadro 1 ha sido bajo el control del promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV35S), de expresión constitutiva en la síntesis de trehalosa.

Las cantidades de trehalosa que sintetizan éstas plantas transgénicas no son tan altas como para que la función principal de este azúcar sea de un agente osmótico y crioprotector. Más bien, el principal efecto de la trehalosa (o de la trehalosa-6-fosfato) en estos organismos podría deberse a que al manipular la vía, se altera la expresión de genes relacionados con la respuesta adaptativa de las plantas al estrés, como el ABI4, el cual está involucrado en la transducción de señales por ABA (Avonce *et al.*, 2004).

Para que la trehalosa actúe como un crioprotector es necesario que se encuentre tanto intracelular como extracelularmente en las plantas (Crowe y Crowe, 2000). En nuestro grupo se contó con líneas transgénicas de crisantemo con capacidad de biosíntesis de trehalosa con el promotor constitutivo CaMV35S, desarrollado por la Dra. Rocío Valle Sandoval, como producto de los programas de mejoramiento genético por ingeniería genética de la Universidad Autónoma Chapingo. En este caso, las plantas se produjeron para explorar la hipótesis de que un mayor contenido endógeno de trehalosa podría alargar la vida post cosecha de las flores, ya que existen reportes que muestran una mayor duración en el florero en gladiolos y tulipanes cuando se adiciona trehalosa al agua en que se mantienen las flores cortadas (Otsubo e Iwaya-Inoue, 2000; Iwaya-Inoue y Takata, 2001).

3.4 Variación somaclonal in vitro

La variación somaclonal puede definirse como la variación entre las plantas regeneradas del cultivo *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1988), y es un fenómeno común en cultivo de tejidos vegetales (Skirvin *et al.*, 1993). La micropropagación *in vitro* es una herramienta importante para el mejoramiento vegetal, y se usa muy frecuente para la inducción de la variación somaclonal. Es causado por cambios en el número cromosómico (poliploidía o aneuploidía, daño a cromosomas, inserciones, deleciones, translocaciones, mutaciones, etc.), o cambios en la metilación de la cromatina (Kaepler y Phillips, 1993; Phillips *et al.*, 1994).

El daño a cromosomas puede ocurrir mediante el entrecruzamiento, replicación retrasada en regiones heterocromáticas, activación de transposones, mutaciones puntuales o rearrreglos del cromosoma (Evans *et al.*, 1984; Peshke y Phillips, 1992; Hirochika *et al.*, 1996). La variación observada por el cultivo de tejidos son de dos tipos: genético y epigenético. Los cambios de la metilación del ADN regularmente se da por efectos epigenéticos, causado por la expresión de genes normalmente suprimidos (Kaepler *et al.*, 2000).

La variación epigenética es frecuentemente inestable y puede desaparecer ya sea después de que las plantas sean removidas del medio de cultivo o dentro de pocos ciclos de generaciones clonales o generaciones sexuales; mientras que la variación genética es heredable (Kaepler *et al.*, 2000). Es por eso que el éxito del mejoramiento genético por medio de la variación somaclonal depende de la estabilidad genética de los clones seleccionados (Biswas *et al.*, 2009).

Estudios revelan que la concentración de auxinas en el medio de cultivo junto con el número de subcultivos, son factores importantes para la inducción de la variación somaclonal en un sistema *in vitro* (Gaafar y Saker, 2006). También se reporta que es ocasionado por la termoterapia de meristemas (Patzak, 2003). La inestabilidad genética es un proceso de valiosa importancia en el mejoramiento genético para generar variación. Sin embargo, esto comienza a ser un fenómeno indeseable cuando el principal objetivo es la micropropagación *in vitro* o transformación genética de materiales seleccionados. Se pueden alterar las características de la planta (como el peso, rendimiento, número de flores/planta, tiempo de floración, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a sales, etc.) como consecuencia de la variación somaclonal (Rout y Mohapatra, 2006). Por ello, es importante evaluar la frecuencia del fenómeno e inferir en el mecanismo y los factores que afectan la estabilidad del ADN.

3.4.1 Marcadores Moleculares: RAPD

Los marcadores moleculares pueden caracterizar la variación somaclonal de origen genético con gran precisión y con menor esfuerzo que los análisis citológicos y fenotípicos (Hao *et al.*, 2004). Existen muchos marcadores moleculares basados en diferentes técnicas para estudiar la presencia o ausencia de alteraciones genotípicas (Rahman y Rajora, 2001). Entre tales marcadores, el ADN Polimórfico Amplificados al Azar (RAPD) son útiles por su sensibilidad, simplicidad y bajo costo, y no se requiere información previa de la secuencia de ADN para poder usar un iniciador; no es necesario el marcaje con radioisótopos y sólo es necesaria una pequeña cantidad de ADN templado (Williams *et al.*, 1990). Es una técnica basada en la amplificación del genoma, por la probabilidad de alineamiento de los iniciadores a diferentes regiones del ADN (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica es aplicable cuando se prueban un número considerable de iniciadores y seleccionando pocos fragmentos RAPD repetibles y claramente interpretables. Es atractivo para caracterizar variedades, y útil para una rápida detección de variaciones genéticas a nivel de ADN (Rival *et al.*, 1998).

3.4.1.1 Base molecular de los RAPDs

Los RAPD emplean iniciadores de 10 nucleótidos con un contenido de GC (guanina-citocina) al menos del 50 %. Los productos de PCR (polimerase chain reaction) son separados en gel de agarosa y detectados por tinción con bromuro de etidio. Para obtener un producto amplificado con un solo iniciador, deben de haber dos secuencias blanco idénticas (o al menos altamente similar) y cercanos: un sitio en una cadena y el otro sitio en la otra cadena, en una orientación opuesta. Teóricamente, los polimorfismos RAPD pueden resultar de varios tipos de eventos: (1) inserción de un fragmento largo de DNA entre los sitios de unión de iniciadores, lo que debe exceder la capacidad de la PCR, resultando en la pérdida del fragmento; (2) inserción o delección de un fragmento pequeño de ADN, cambiando el tamaño de un fragmento amplificado; (3) delección de uno de los dos sitios de alineamiento del iniciador,

ocasionando la pérdida del fragmento o un incremento en el tamaño; (4) la sustitución de un nucleótido dentro de uno o en ambos sitios blanco del iniciador puede afectar el proceso de alineamiento, originando la presencia o ausencia de polimorfismo o un cambio en el tamaño del fragmento (Weising *et al.*, 2005).

3.4.1.2 Propiedades de los marcadores RAPD

Dado que las secuencias de los iniciadores RAPD se diseñan arbitrariamente, se espera que el genoma sea muestreado aleatoriamente. Una desventaja obvia de los RAPD con otros marcadores multilocus es su herencia dominante, que limita su uso en poblaciones genéticas y estudios de mapeo. Se observan fragmentos en una condición de homocigosis (AA) así como en heterocigosis (Aa), y solo la ausencia del fragmento revela claramente el genotipo recesivo en homocigosis (aa). Para muchas aplicaciones, la naturaleza dominante de los fragmentos RAPD es una desventaja (ejemplo en poblaciones genéticas). La herencia dominante no es problemático en situaciones de haploides ni en el estudio de variaciones de DNA (Weising *et al.*, 2005).

El uso de los fragmentos RAPD como marcadores moleculares es en ocasiones complicado por la variación en la intensidad de las bandas. La claridad de una banda dependerá de varios factores, como el grado de repetitibilidad de una región blanco de ADN, la extensión de un mal alineamiento primer-templado, y la presencia o ausencia de regiones blanco de competencia por iniciadores en el genoma. La variación en la intensidad de las bandas comigrantes es una de las molestias encontradas durante la conversión de un patrón de bandeo a una matriz binaria de caracteres.

3.5 Estabilidad genética de plantas crioconservadas

En conservación a ultra bajas temperaturas (crioconservación), los tejidos están expuestos a diferentes tipos de estrés tales como físicos, químicos y fisiológicos que pueden provocar daños, teniendo efectos sobre el genoma. Por tal razón, es necesario la evaluación de la estabilidad genética y epigenética de

las plantas para verificar la fidelidad del material crioconservado, como una de las etapas más importantes para aplicar correctamente cualquier protocolo de almacenamiento (Williams *et al.*, 1990). La variación somaclonal en plantas crioconservadas se ha encontrado por Harding (2004). Las causas de estas variaciones es atribuido usualmente a los procesos de proliferación y regeneración *in vitro*, más que a la crioconservación por sí misma (Harding, 1997).

No existen evidencias concretas de alteraciones morfológicas, citológicas o genéticas por el efecto de la crioconservación (Harding, 1994). Mandal (1997) confirmó el mantenimiento de la estabilidad genética en papa, *Coleus forskohli*, *Allium tuberosum*, mediante estudios morfológicos y longitud de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP's). Martín y González-Benito (2005), detectaron variación somaclonal usando marcadores RAPD en crisantemo después de la crioconservación. Posteriormente, evaluaron las diferencias genéticas que aparecieron en la variante, la clonaron y secuenciaron el ADN para obtener más información acerca de la genética de la variación somaclonal en los procesos de crioconservación (Martín y González-Benito, 2006).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en el laboratorio de Biotecnología Aplicada del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Las plantas madre de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) var. Indianápolis *in vitro*, transgénico y no transgénico, se cultivaron y mantuvieron en medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado AIA 1 mg.L⁻¹, BA 3 mg.L⁻¹ y sacarosa 30 g.L⁻¹, solidificado con agar 7 g. L⁻¹, a un pH de 5.7 (medio basal). Los cultivos fueron incubados a 25±1 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 (día/noche) con una intensidad lumínica de 68 µmol.m⁻².s⁻¹, provista por lámparas fluorescentes blancas.

4. 1 Características del material transgénico (ver apéndice I).

4.2 Procedimientos de crioconservación

Para los experimentos de crioconservación, se usaron plántulas de crisantemo *in vitro* de 4 semanas de edad. Los ápices (0.5-1 mm, que consistió en el domo y 2-3 primordios de hoja) fueron extraídos con ayuda del microscopio estereoscopio y cultivados en medio MS semisólido.

4. 2.1 Protocolo de vitrificación.

1) **Pre-cultivo.** Los ápices disectados de plántulas *in vitro* fueron precultivadas en medio basal con sacarosa 0.3 M, trehalosa 0.3 M y sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M por 1-7 días cada una, e incubadas en las mismas condiciones descritas arriba para la planta madre.

2) **Carga.** La solución de carga fue adicionada a los ápices precultivadas por un tiempo de 20 min. a 25 °C en un medio basal líquido con glicerol 2 M + sacarosa 0.4 M, a un pH de 5.7 (Matsumoto *et. al.*, 1994).

3) **Deshidratación osmótica.** Los ápices se trataron con las soluciones vitrificadoras denominadas "PVS2" y "PVS3" (0.7 ml en crioviales) a 25 °C durante por 0-60 minutos. La solución PVS2 consiste de glicerol 30 %, etilen

glicol 15 %, dimetil sulfóxido (DMSO) 15 % y sacarosa 0.4 M (Sakai *et. al.*, 1990); la solución PVS3 consta de glicerol 50 % y sacarosa 50 % (Nishizawa *et.al.*, 1993).

4) **Congelamiento y almacenaje.** Después del tratamiento de deshidratación con las soluciones PVS's, las muestras se congelaron en crioviales por inmersión directa en nitrógeno líquido, donde permanecieron para su almacenaje.

5) **Descongelamiento y "descarga".** Los viales se sacaron después de 1 hora en nitrógeno líquido y se descongelaron las muestras rápidamente (2-3 min) mediante un baño de agua a + 40 °C. Posterior al descongelamiento, se removieron las soluciones con medio basal líquido suplementado con sacarosa 1.2 M (pH 5.7) por 15 minutos a 25 °C (en 2 ocasiones).

6) **Recuperación.** Los ápices descongelados se cultivaron en medio basal para su recuperación y se colocaron a la oscuridad por una semana, para pasarlos más tarde a las condiciones controladas de temperatura e iluminación para el cultivo.

4.2.2 Toma de datos y análisis estadístico.

El diseño experimental usado fue completamente al azar con 12 repeticiones. La unidad experimental fue una caja petri con 20 explantes. Se evaluó la variable respuesta regeneración, expresada en porciento, tomada a los 45 días después de la aplicación de los tratamientos. El porcentaje fue analizado mediante pruebas de comparación de dos proporciones binomiales por pares de tratamientos (Infante y Zárate, 1984).

4.3 Estabilidad Genética

Se tomaron 10 muestras de plantas crioconservadas (tratadas con PVS 2 y 3) y 10 no crioconservadas (4 plantas que provenían de la propagación *in vitro*, 2 en precultivo, y 2 plantas con tratamiento en las PVS's) tanto del control, de la LT1 y LT2, como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2. Diseño del muestreo de plantas regeneradas para la estabilidad genética antes de la crioconservación (-NL) y después de la crioconservación (+NL) de las líneas transgénicas y del control.

Muestra	No crioconservado	Muestra	Crioconservado
1	Sin tratamiento*	11	PVS2
2		12	
3		13	
4		14	
5	Precultivo	15	PVS3
6		16	
7	PVS2	17	
8		18	
9	PVS3	19	
10		20	

* sometidas a propagación por cultivo *in vitro*

Se extrajo un total de 60 muestras de ADN en todo el experimento (20 por cada línea).

4.3.1 Purificación de ADN

La extracción de ADN de plántulas de crisantemo se hizo tres meses después de la regeneración, cuando las plántulas alcanzaron un peso aproximado de 300 mg, de acuerdo al método reportado por Dellaporta *et al.* (1983) con ligeras modificaciones. A partir de la plántula completa, se tomaron 0.2 mg de tejido fresco para macerarlo en nitrógeno líquido; el tejido pulverizado se pasó a tubos eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 600 µl de amortiguador de extracción con el que se mezcló, agitando por unos segundos; se incubó a 65 °C por 10 min, con la inversión ocasional de los tubos; se adicionó 200 µl de acetato de potasio 5 M, manteniéndolo en agitación por inversión y se dejó 30 min., después se centrifugo a 15,000xg durante 10 min. a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo con 700 µl de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C durante 30 min; en seguida, se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente. Después de la cual se eliminó el sobrenadante y, el precipitado fue disuelto en 200 µl de solución para diluir. Posteriormente se añadió 2 µl de ARNasa y se incubó a 37

°C por una hora, se agregó 20 µl de acetato de sodio 3 M y 200 µl de isopropanol frío; se mezcló por inversión y se dejó a -20 °C por 2 h. Después se centrifugó por 5 min a 10,000xg a temperatura ambiente y el sobrenadante se eliminó. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol al 70 % y se dejó secar la pastilla, la cual se disolvió después en 50 µl de TE y se almacenó a 4 °C. En el cuadro 3 hace referencia a los reactivos empleados y las concentraciones a los cuáles deben estar para llevar a cabo la de extracción de ADN.

Cuadro 3. Reactivos empleados en la preparación de amortiguadores.

REACTIVOS	AMORTIGUADORES
Amortiguador de extracción	Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na ₂ 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0.
Solución para diluir	Tris-HCl 50 mM EDTA-Na ₂ 10 mM, pH 8.0.
ARNasa	10 mg/ml EN Tris-HCl 10 mM, CaCl ₂ mM, glicerol 50 % Ph 7.0. Antes de usar, hervir en baño de agua por 30 min.
Acetato de potasio	5 M
Acetato de sodio	3 M
Isopropanol frío	-20 ° C
Etanol	70 % (v/v)

4.3.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

4.3.2.1 Cuantificación de ADN

Utilizando ADN purificado de plantas, se cuantificó su cantidad en un espectrofotómetro NanoDrop®. Posteriormente, se verificó su integridad y calidad en un gel de agarosa al 0.8 % (p/v), para lo que se siguió el procedimiento siguiente: para saber cuántos µl de ADN original se necesita para cargar 1 µg en el gel se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l de ADN original para cargar } 1 \mu\text{g; } = \frac{(1 \mu\text{g} \cdot 1 \mu\text{l de ADN}) (1 \mu\text{l})}{([\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1})}$$

Realizados todos los cálculos, se procedió a preparar el gel de calidad bajo la siguiente metodología: para la preparación de un gel de agarosa al 0.8 %, se colocó en un matraz con amortiguador de corrida TAE 1X (Cuadro 4), se calentó en un horno de microondas para fundir la agarosa; se dejó enfriar hasta unos 50 °C y se vació en el portagel. Posteriormente se colocó el peine y se

dejó enfriar hasta que solidificó. Se quitó el peine y se mezcló el ADN con el colorante de carga, se colocó cada muestra en los pozos del gel y se corrió la electroforesis a 100 V hasta finalizar la electroforésis. Finalmente, el gel se extrajo de la cámara de electroforesis y se tiñó con una solución de bromuro de etidio y se documentó.

Cuadro 4. Soluciones utilizadas para teñir geles de agarosa

SOLUCIONES	REACTIVOS
Amortiguador TAE	Tris-base 40 mM (pH 7.8), acetato de sodio 20 mM, EDTA 2 Mm (pH 8.0)
Amortiguador de carga	0.2 % azul de bromofenol (p/v) 0.2 % xileno cianol (p/v) 25 % glicerol (v/v) 5 Mm EDTA 50 Mm Tris-HCl (pH 8.0)
Bromuro de etidio	0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ en TAE 1X

4.3.3 Obtención de los patrones RAPD

Para la obtención de los patrones RAPD se probaron 8 iniciadores ROTH de la serie B (Cuadro 5).

Cuadro 5. Iniciadores ROTH-B usados para generar marcadores RAPD.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
1	GTTTCGCTCC
2	TGATCCCTGG
3	CATCCCCCTG
4	GGA CTGGAGT
5	TGCGCCCTTC
6	TGCTCTGCCC
7	GGTGACGCAG
8	GGACCCTTAC

Para verificar si los iniciadores detectaban polimorfismos se incluyó muestras de ADN de plantas de crisantemo de la variedad Puma y Eleonora.

4.3.3.1 Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs

Con los reactivos referidos en el cuadro 6, se realizó una mezcla para 60 reacciones en el cual se agregó la cantidad en μl indicada en cada caso, adicionando al final la enzima, se le da un vortex (mezcla en forma de remolino) y se agrega en cada tubo de reacción la cantidad de 21 μl , conteniendo 4 μl del ADN correspondiente. Se incubaron los tubos eppendorf en el termociclador y se llevó a cabo la reacción de polimerización bajo las condiciones que se indican en el cuadro 7.

Cuadro 6. Mezcla de reacción PCR para obtención de los patrones RAPDs.

REACTIVOS	1 X (μL)
Agua estéril	5.75
dNTPs (2 mM c/u)	7.5
Amortiguador 10 x	2.5
MgCl_2 (50 mM)	5
Iniciador (10 pmol/ μl)	2
ADN (10 ng/ μl)	4
Enzima (Taq ADNpol, 5 u/ μl)	0.3

Cuadro 7. Programa térmico de PCR

FASE	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)
Pre-desnaturalización	94
Desnaturalización	92
Alineamiento	37
Extensión	72
Extensión final	72
Del programa principal se dieron 35 ciclos (92, 37 y 72 $^{\circ}\text{C}$)	

4.3.3.2 Análisis de datos

Se observaron los patrones RAPDs luego de realizar electroforesis en un gel de agarosa a 1.5 % y teñido con bromuro de etidio. La comparación entre las plantas crioconservadas y no crioconservadas se hizo evaluando las similitudes y las diferencias en los patrones de bandeo, asignando el valor de 0 a la ausencia y 1 a la presencia de una banda. Se cuantificó el número de bandas producto de la amplificación para cada iniciador, asignándose un número de acuerdo con la distancia de migración en el gel. Se realizó un registro de los patrones RAPD obtenidos con los 8 iniciadores para todas las plantas y con esa información se construyó una tabla para indicar el número de loci amplificados por cada iniciador.

V. RESULTADOS

5.1 Optimización de la duración del precultivo de los ápices: precultivo en sacarosa

Las mejores condiciones de sobrevivencia del material vegetal en el precultivo se obtuvieron a los 4 días, tanto para el control (C) así como para las dos líneas transgénicas 35S-8 (LT1) y 35S-19 (LT2) (Cuadro 8). Los ápices reactivaron el crecimiento 8 días después de la remoción de sacarosa del medio de cultivo. Se observó un efecto negativo (toxicidad) en la recuperación de las plantas al incrementar la duración del precultivo a más de 4 días; expresado a través del necrosamiento de los tejidos.

Cuadro 8. Efecto de la duración del precultivo en la sobrevivencia de ápices de crisantemo en medio de cultivo con sacarosa 0.3 M.

Días de precultivo	Sobrevivencia (%)		
	C	LT1	LT2
1	100 a ²	95 a	88 a
2	100 a	90 ab	80 ab
3	93 ab	90 ab	70 b
4	90 ab	90 ab	70 b
5	85 ab	88 b	68 bc
6	84 b	72 c	66 bc
7	80 b	58 d	52 c

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

A los 4 días de precultivo, el control y la LT1 fueron superiores (90 % de sobrevivencia en ambos casos) que la LT2 (70 %).

5.1.1 Efecto del tratamiento con las soluciones de vitrificación en la crioconservación de los explantes de crisantemo precultivados en sacarosa

Optimizada la duración del precultivo en sacarosa, se evaluó el efecto de las soluciones de vitrificación para eliminar aún más la cantidad de agua en los tejidos y poder tolerar el congelamiento.

5.1.1.1 Efecto de la deshidratación osmótica con PVS2

Una vez adaptado bien el protocolo de vitrificación de material no transgénico, el siguiente paso fue evaluar el efecto que tiene la trehalosa que acumulan las plantas transgénicas de crisantemo en precultivo en sacarosa.

Antes del congelamiento (-NL) la regeneración del control fue mejor que las líneas transgénicas, pero cuando los explantes se congelaron (+NL) los mejores valores de regeneración se presentó en las transgénicas (Figura 5). La inmersión inmediata de los explantes (0 min) al NL no proporcionó en ningún caso la sobrevivencia. Conforme aumentó el tiempo de deshidratación osmótica en PVS2, la sobrevivencia también incrementaba hasta alcanzar un máximo a los 40 min, después de este tiempo, la sobrevivencia disminuyó considerablemente en el control y la LT2 (Cuadro 9).

No existieron diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) a los 30 y 40 minutos de deshidratación osmótica con PVS2 del control y de la LT2. En la TL1, la óptima deshidratación se obtuvo a los 40 min. La regeneración después del congelamiento de LT2 (67 %) fue superior al control (33 %) y a la LT1 (48 %) con $p=0.05$ (Figura 4a).

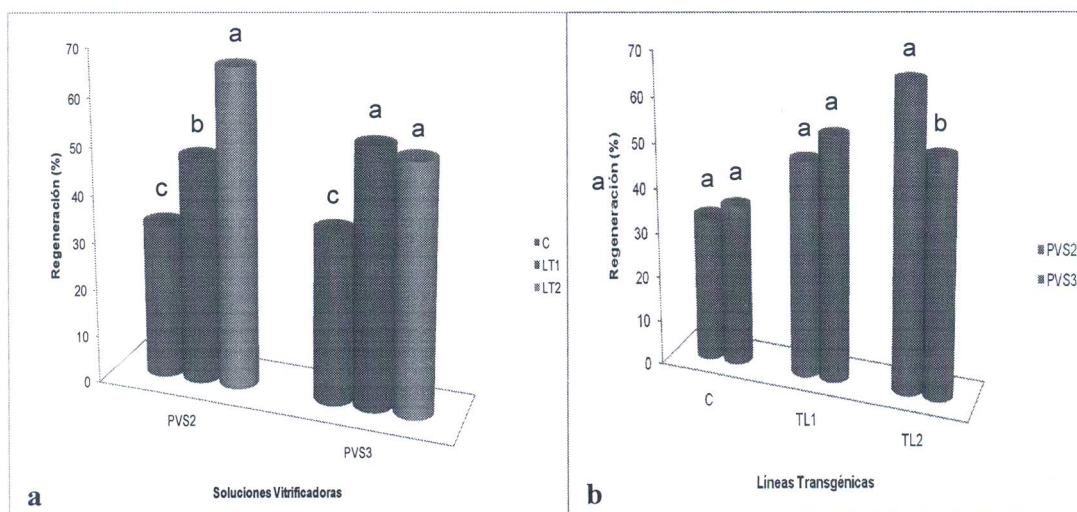


Figura 4. Comparación entre explantes del control, LT1 y LT2 (a) y la comparación entre las soluciones vitrificadoras a los 40 min de exposición (b) provenientes del precultivo en sacarosa y congeladas en NL.

5.1.1.2 Efecto de la deshidratación osmótica con PVS3

Al evaluar el efecto de los tratamientos con la PVS3, la sobrevivencia de los ápices se redujo sólo en la TL2. En el control y la TL1, no existió diferencias estadísticas entre utilizar la PVS2 o la PVS3 con $p=0.05$ (Figura 4b).

El comportamiento de la sobrevivencia antes (-NL) y después (+NL) del congelamiento con la PVS3 fue similar a la observada con la PVS2. Con la PVS3, es necesaria la deshidratación osmótica a los 40 min para poder conferir tolerancia al congelamiento a los explantes (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en sacarosa 0.3 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.

Duración de exposición a PVS (min)	Regeneración (%)											
	PVS2						PVS3					
	-LN			+LN			-LN			+LN		
	C	LT1	LT2	C	LT1	LT2	C	LT1	LT2	C	LT1	LT2
0	100 a ^z	65 a	60 a	0 d	0 d	0 d	100 a	56 a	49 a	0 d	0 d	0 d
10	92 b	53 ab	59 ab	3 c	0 d	12 b	90 b	55 ab	38 a	0 d	0 d	10 c
20	90 bc	44 ab	44 b	11 b	16 c	19 b	86 b	50 ab	28 b	10 c	12 c	16 b
30	90 bc	30 b	40 bc	27 a	30 b	63 a	75 c	48 ab	26 b	22 b	26 b	25 b
40	86 bc	24 bc	32 c	33 a	48 a	67 a	72 c	42 ab	23 bc	36 a	54 a	52 a
50	85 c	19 c	14 d	2 c	24 b	10 c	71 c	25 b	14 c	4 c	57 a	10 c
60	70 d	18 c	10 d	0 d	13 c	0 d	62 d	24 b	15 c	0 d	14 c	0 d

^zValores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

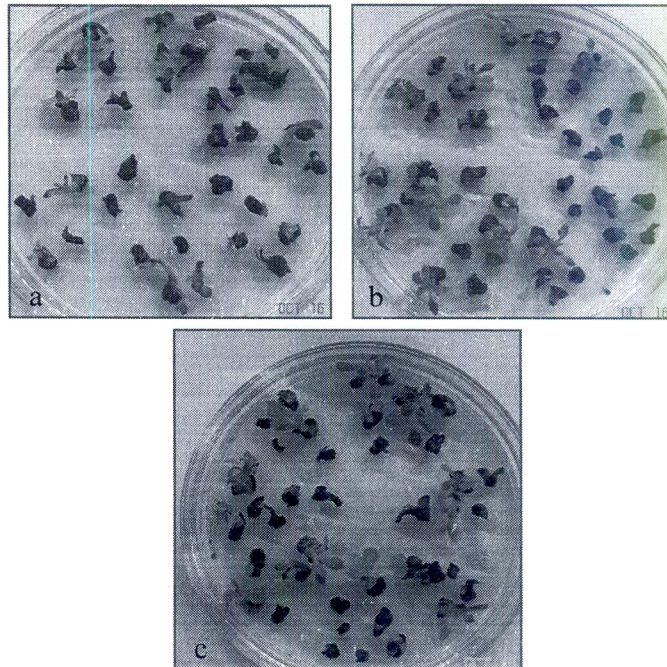
C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

En caso de la LT1, los explantes soportaron la deshidratación hasta los 50 min, aunque no existieron diferencias estadísticas en la sobrevivencia con la obtenida a los 40 min ($p=0.05$). Se observó la disminución de la sobrevivencia en la LT2 con la PVS3 (52 %) en comparación con la PVS2 (67 %). A pesar de esto, la LT2 fue superior al control (36 %), siendo estadísticamente igual a la LT1 (54 %) con $p=0.05$ (Figura 4a).

No se obtuvo sobrevivencia a los 0 y 60 minutos de deshidratación osmótica en el control y la LT2. La disminución en la sobrevivencia de LT1 fue

menos drástica y gradual después de los 40 minutos de deshidratación del material vegetal, registrando sobrevivencia aún a los 60 min de deshidratación (13 y 14 % en PVS2 y PVS3 respectivamente).

Figura 5. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivados en sacarosa 0.3 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.



Durante la recuperación y desarrollo de las plantas que sobrevivieron a la criopreservación, se mantuvieron las características morfológicas y de crecimiento idéntico al fenotipo inicial de cada material biológico (considerando que el fenotipo de las plantas madre de las plantas transgénicas es más compactas, con entrenudos más cortos que el control). Inicialmente, la velocidad de crecimiento de las plantas transgénicas recuperadas mostraron una ligera disminución en comparación con la planta control (Figura 6). La recuperación y desarrollo de la TL2 fue más lento que la TL1 y el control.

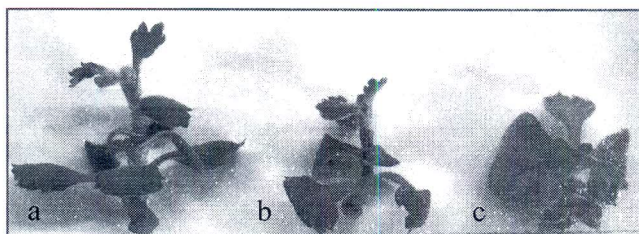


Figura 6. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en sacarosa 0.3, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.

5.2 Efecto de la trehalosa extracelular en precultivo y las soluciones de vitrificación durante el congelamiento

5.2.1 Precultivo en trehalosa

La trehalosa tuvo un efecto tóxico a la concentración de 0.3 M en el precultivo y presenta las tasas más bajas de sobrevivencia de las poblaciones en estudio en comparación con la sacarosa, a la misma concentración. Las sobrevivencias más bajas correspondieron a la LT2 y disminuyó conforme transcurrieron los días de precultivo. La sobrevivencia del control y la LT1 fueron similares (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de la duración del precultivo de los ápices en la sobrevivencia en medio de cultivo con trehalosa 0.3 M.

Días de precultivo	Sobrevivencia (%)		
	C	LT1	LT2
1	100 a ^z	100 a	64 a
2	97 a	93 b	60 ab
3	91 b	88 bc	58 ab
4	81 c	83 c	50 b
5	73 cd	75 c	25 c
6	63 cd	54 d	18 cd
7	60 d	42 e	15 d

^zValores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial

C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

En el primer día de precultivo, la reducción de sobrevivencia de la LT2 era considerable (36 % de pérdida), llegado al 50 % de la muerte de los explantes a los 4 días, en tanto que el control fue de 81 % y la LT1 de 83 %.

5.2.2 Efecto crioprotector durante el congelamiento

La trehalosa incrementó significativamente la sobrevivencia en el control con la PVS3, pero tuvo un efecto contrario con las transgénicas (principalmente la LT2) con las dos soluciones de vitrificación (Figura 8).

El control presentó los porcentajes más altos de regeneración después del congelamiento que las líneas transgénicas. Con la PVS2, no hubo diferencias estadísticas ($p=0.05$) entre la máxima sobrevivencia del control (31 %) y las líneas transgénicas (20 % para LT1 y 18 % para LT2) (figura 7a).

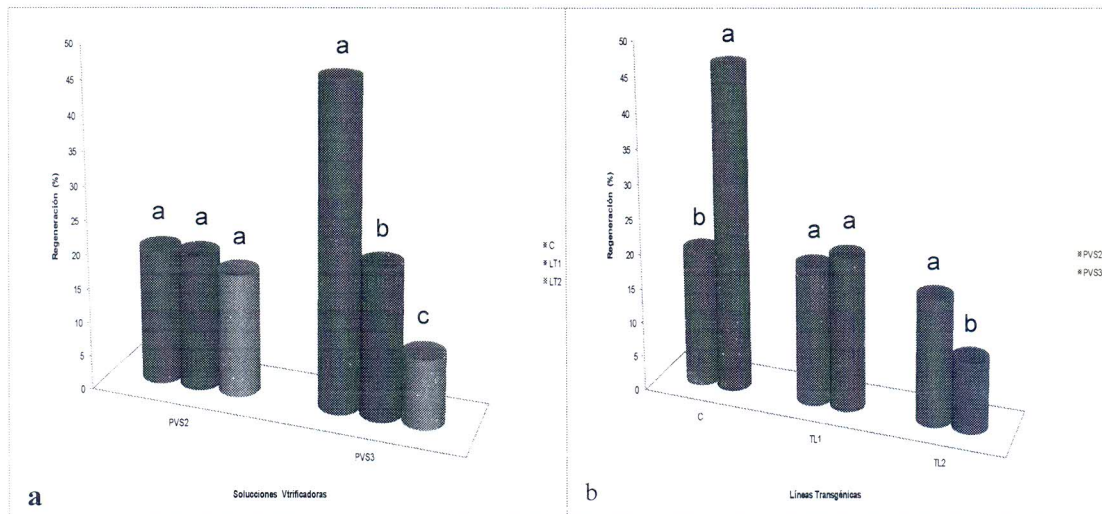


Figura 7. Comparación entre el control, LT1 y LT2 (a) y la comparación entre las soluciones vitrificadoras (b).

En contraste con el precultivo en sacarosa, la trehalosa adicionada al medio de precultivo proporcionó tolerancia al congelamiento de los explantes sin necesidad de deshidratarlos con las soluciones de vitrificación, ya que con el congelamiento inmediato en NL (0 min), el control alcanza una sobrevivencia del 12 %, 20 % la LT1 y 18 % la LT2. No obstante, conforme aumentó la duración de deshidratación del control, la sobrevivencia también fue incrementando hasta alcanzar el máximo a los 30 min, no siendo así para las líneas transgénicas, las cuáles, conforme aumentaba el tiempo de deshidratación también disminuía la sobrevivencia de los explantes (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en trehalosa 0.3 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min., deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.

Duración de exposición a PVS (min)	Regeneración (%)											
	PVS2						PVS3					
	-LN			+LN			-LN			+LN		
	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2
0	86 a ^z	60 a	51 a	12 c	20 a	18 a	72 a	50 a	46 a	10 c	22 a	10 a
10	80 ab	56 a	50 a	18 b	20 a	12 a	71 a	49 a	45 a	25 b	18 a	6 a
20	80 ab	48 ab	39 ab	20 b	12 b	3 b	63 b	48 a	34 ab	37 a	8 b	0 b
30	73 b	42 ab	30 b	31 a	0 c	0 c	48 c	33 b	30 b	47 a	0 c	0 b
40	56 c	38 b	22 bc	7 d	0 c	0 c	30 d	30 bc	21 bc	0 d	0 c	0 b
50	40 d	20 c	17 c	0 e	0 c	0 c	16 e	20 c	16 c	0 d	0 c	0 b
60	32 c d	17 c	8 d	0 e	0 c	0 c	10 e	20 c	11 cd	0 d	0 c	0 b

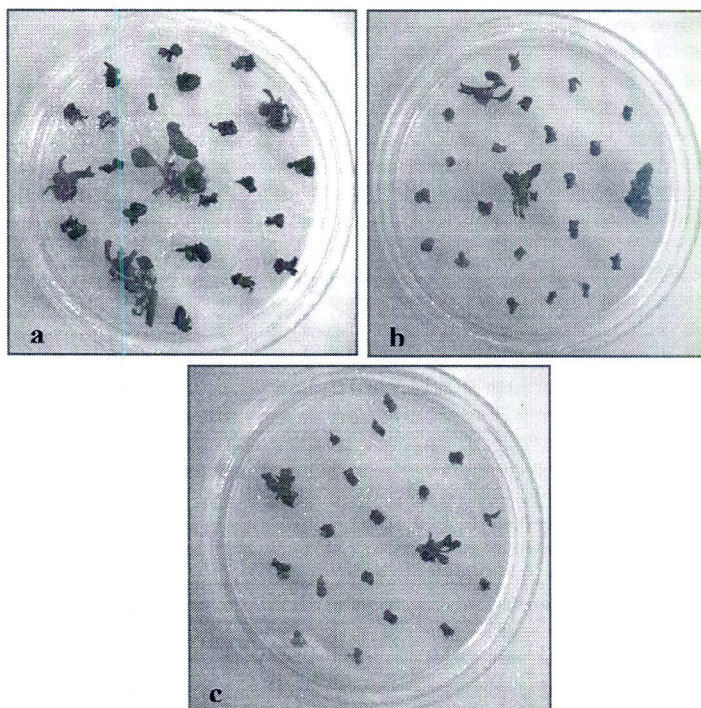
^zValores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

Se observaron diferencias estadísticas con $p=0.05$ entre las tres poblaciones evaluadas con el uso de la PVS3 (Figura 7a). El control registró 47 % de sobrevivencia a los 30 min, la LT1 con 22 % a 0 min, y la LT2 con 10 % a 0 min. La sobrevivencia entre las dos soluciones de vitrificación fueron diferente sólo en el control, 31 % PVS2 vs 47 % con PVS3; para las transgénicas, el comportamiento no fue diferente en ninguna condición (Figura 7b).

La muerte celular es mucho más acentuada con la PVS3, ocurriendo la pérdida total de la sobrevivencia a los 20 minutos de deshidratación para la LT2. Los explantes que no soportaron el congelamiento adquirieron una apariencia blanquecina, a diferencia a la exhibida en el precultivo en sacarosa, que fue café oscuro.

Figura 8. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivados en tehalosa 0.3 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.



En comparación con las plantas provenientes del precultivo en sacarosa, las plantas recuperadas son más compactas y la reactivación del crecimiento es ligeramente más lento. Al transcurso del tiempo, las plantas mostraron la morfología y crecimiento normal (Figura 9).

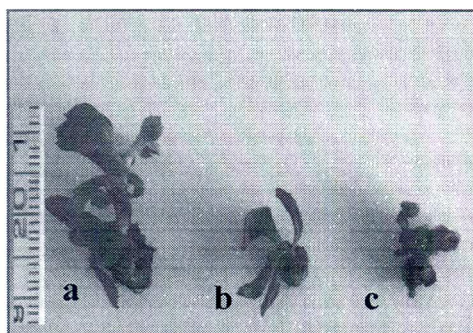


Figura 9. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en trehalosa 0.3 M, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.

5.3 Incremento de la sobrevivencia del material crioconservado mediante el efecto combinado de trehalosa y sacarosa

5.3.1 Precultivo en sacarosa en combinación con trehalosa

Con el propósito de contrarrestar el efecto negativo de la aplicación exógena de la trehalosa en las transgénicas, se combinó la trehalosa con la sacarosa a una concentración de 0.15 M cada una.

La combinación de trehalosa con la sacarosa en el medio de precultivo (e aplicación exógena), contrarrestó el efecto obtenido con la trehalosa por sí sola. Con este precultivo, la sobrevivencia de las transgénicas, fue más elevada. El control mantuvo el mismo comportamiento observado en el precultivo solo con trehalosa (Cuadro 12).

A los 4 días de precultivo, el control y la LT1 mantuvieron el 90 % de sobrevivencia y la LT2 el 70 %, siendo el valor más alto en comparación con los precultivos anteriores (en sacarosa y trehalosa).

Cuadro 12. Efecto de la duración del precultivo de los ápices en la sobrevivencia en medio de cultivo con sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M.

Días de precultivo	Sobrevivencia (%)		
	C	LT1	LT2
1	100 a ²	98 a	87 a
2	99 ab	98 a	80 ab
3	96 b	92 b	74 b
4	90 c	90 b	70 b
5	79 d	81 c	56 c
6	75 d	66 d	51 c
7	70 d	60 d	34 d

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial

C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

5.3.2 Congelamiento en presencia de trehalosa exógena y endógena

Con el precultivo en sacarosa combinada con trehalosa, el control no mejoró la sobrevivencia al congelamiento en PVS2 (38 %) ni con PVS3 (45 %) con $p=0.05$. En cambio, incrementó la sobrevivencia en las líneas transgénicas (Cuadro 13), siendo los porcentajes más altos de regeneración después del congelamiento que el precultivo en sacarosa y trehalosa (Figura 10a, Figura 11).

En el control, la duración de deshidratación más apropiada fue a los 40 minutos, con porcentajes de 38 % y 45 % con la PVS2 y PVS3 respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas entre ellas ($p=0.05$) (Figura 10b). La inmersión directa (0 min) y a los 10 min en NL no permitió la sobrevivencia de los explantes en ninguna población, tampoco después de los 50 minutos.

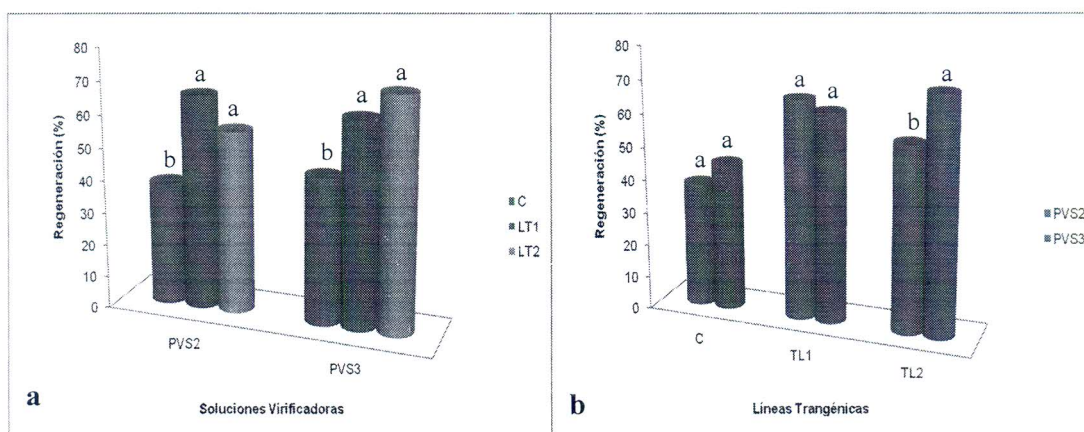


Figura 10. Comparación entre el control, LT1 y LT2 (a) y comparación entre las soluciones vitrificadoras (b).

La verdadera capacidad crioprotectora de la trehalosa se manifestó con su presencia exógena y endógena en la célula, proporcionada durante el precultivo de 4 días y mediante el uso de las líneas transgénicas.

Sin duda, la combinación de crioprotectores regresó la capacidad de tolerancia al congelamiento de las líneas transgénicas a la mostrada en precultivo en trehalosa. No existieron diferencias estadísticas entre las dos

soluciones vitrificadoras con $p=0.05$ en el control y la LT1, pero sí fue diferente en la LT2, siendo mejor la PVS3 (Figura 10b).

Cuadro 13. Efecto del tiempo de deshidratación osmótica en la regeneración de ápices de crisantemo antes (-NL) y después del congelamiento (+NL). Los explantes fueron precultivados en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M por 96 h, tratamiento de carga por 20 min., deshidratación con las PVS's y la inmersión en NL.

Duración de exposición a PVS (min)	Regeneración (%)											
	PVS2						PVS3					
	-LN			+LN			-LN			+LN		
	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2	C	TL1	TL2
0	100 a ^z	80 a	75 a	0 d	1 d	0 e	100 a	68 a	56 a	0 d	0 e	0 e
10	98 ab	80 a	63 b	0 d	6 c	6 c	100 a	45 b	50 a	5 c	6 d	10 d
20	98 ab	53 b	60 b	11 b	14 c	11 c	99 ab	44 bc	43 ab	16 b	19 c	18 c
30	95 b	40 b	33 c	28 a	39 b	36 b	96 b	40 bc	43 ab	30 a	38 b	43 b
40	86 c	27 c	20 d	38 a	66 a	56 a	95 b	37 bc	43 ab	45 a	63 a	71 a
50	79 d	25 c	20 d	3 c	32 b	3 d	80 c	30 c	29 b	0 d	26 b	10 c
60	71 d	20 c	17 d	0 d	28 b	0 e	80 c	26 c	14 c	0 d	21 c	9 d

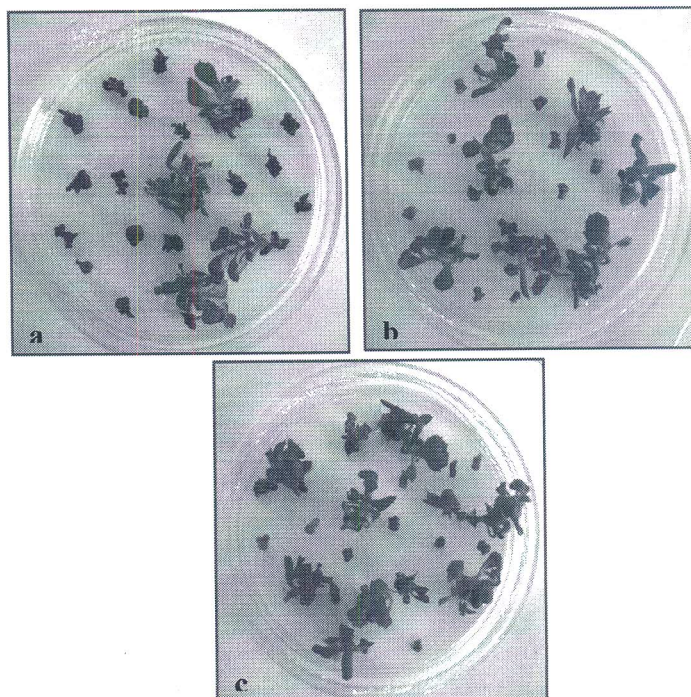
^zValores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

C: control, LT1: Línea transgénica 8, LT2: Línea transgénica 19

Con la PVS2 se alcanzaron valores de sobrevivencia (+NL) de 66 % y 56 %, para la LT1 y LT2 respectivamente, datos estadísticamente iguales, así mismo para la PVS3 (63 % para LT1 y 71 % con la LT2). Sólo se observó diferencia estadística entre las dos soluciones de vitrificación con la LT2 (56 % con PVS2 vs 71 % de la PVS3) (Figura 10b). La deshidratación osmótica adecuada se logró con una exposición de los explantes a las soluciones vitrificadoras por 40 minutos.

No se observaron anomalías en el crecimiento de la planta, tampoco en su morfología. La tolerancia al congelamiento se logró con todos los tiempos de deshidratación por parte de la PVS2, mientras que la PVS3 no fue capaz de conferir resistencia sólo con la inmersión inmediata de explantes al NL (en la LT2) y después de los 50 minutos (en control).

Figura 11. Regeneración de los ápices de crisantemo a los 45 días después del congelamiento del control (a), LT1 (b) y LT2 (c). Los ápices fueron precultivos en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M por 4 días, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congeladas en NL.



La reactivación del crecimiento de las líneas transgénicos fue muy similar a la observada en el control (Figura 12).

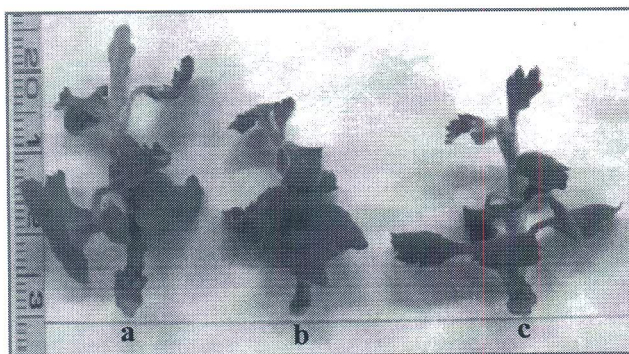


Figura 12. Crecimiento de las plantas del control (a), LT1 (b) y LT2 (c) a los 65 días de la recuperación. Las plantas provienen del precultivo en sacarosa 0.15 M + trehalosa 0.15 M, tratamiento de carga por 20 min, deshidratación osmótica con PVS3 por 40 min y congelamiento en NL.

5.4 Resumen de resultados de la crioconservación

La sobrevivencia de ápices de la línea transgénica LT2 en precultivo en sacarosa fue superior a la LT1 y al control con la deshidratación en PVS2, siendo estadísticamente iguales las transgénicas en PVS2, y aún superiores que el control. En precultivo en trehalosa sola, las transgénicas disminuyeron la tolerancia al congelamiento, mientras que el control incremento la sobrevivencia con el tratamiento con PVS3. Líneas transgénicas así como el control se comportaron iguales en PVS2. Con la adición de sacarosa (combinación) en medio de precultivo con trehalosa, se restauró la capacidad de tolerancia al congelamiento de los explantes transgénicos, manteniendo la capacidad en los ápices del control que en el precultivo con trehalosa sola. Las transgénicas se comportaron igual en PVS2 y PVS3 (Figura 13).

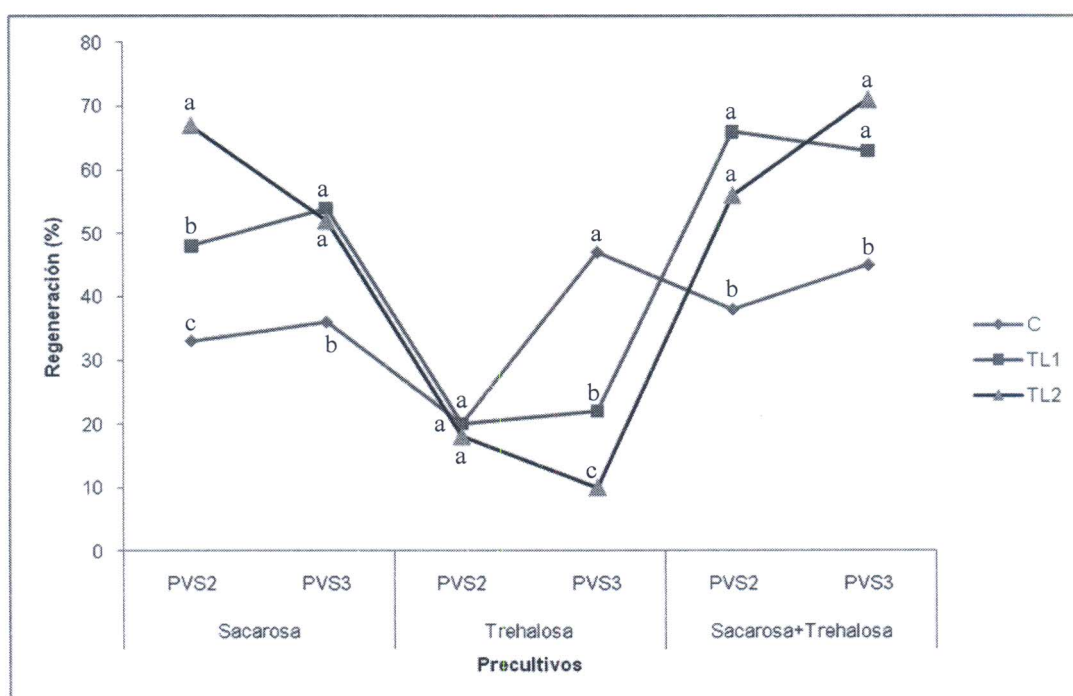


Figura 13. Comportamiento de las líneas en estudio en cada nivel de precultivo y solución de vitrificación.

5.5 Estabilidad Genética

Los productos amplificados se compararon entre las muestras para detectar algún cambio producido durante la crioconservación. Algunas muestras se amplificaron dos veces para confirmar cualquier cambio, ya que los RAPDs pueden presentar problemas de repetibilidad.

5.5.1 Plantas crioconservadas.

Usando 8 iniciadores, la técnica RAPD amplificó 98 *loci* para cada muestra de ADN (Apéndice II). El análisis RAPD indica que no hay variación del ADN genómico en ninguna de las plantas analizadas (Cuadro 14, Figura 14a). Los tamaño de los frangmentos RAPD fueron desde los 0.25 kb hasta 4 kb.

Cuadro 14. Número de *loci* detectados por cada iniciador generados por RAPD en muestras de ADN crioconservadas y no crioconservadas de crisantemo 'Indianápolis'.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Loci	
		Monomórficos	Polimórficos
ROTH-01*	GTTTCGCTCC	16	0
ROTH-02	TGATCCCTGG	7	0
ROTH-03	CATCCCCCTG	6	0
ROTH-04	GGA CTGGAGT	16	0
ROTH-05	TGCGCCCTTC	13	0
ROTH-06	TGCTCTGCCC	17	0
ROTH-07	GGTGACGCAG	13	0
ROTH-08	GGACCCTTAC	10	0
Total		98	0
Media		12,3±28.9	0

*para cada iniciador se usaron 20 muestras de ADN de plantas crioconservadas y no crioconservadas (como se indica en materiales y métodos)

Inicialmente, se detectaron cambios en la intensidad de una banda en la fase de precultivo en el control (Figura 14b), en la LT2 sin ningún tratamiento (proveniente de cultivo *in vitro*, Figura 14d) y un polimorfismo en la LT1 (Figura 14 c y d) en el precultivo, pero cuando se repitió el análisis sólo se detectó

mayor intensidad de dos bandas en la LT2, pero con otro iniciador (Figura 15), las demás alteraciones y polimorfismo ya no se lograron detectar con los mismos iniciadores.

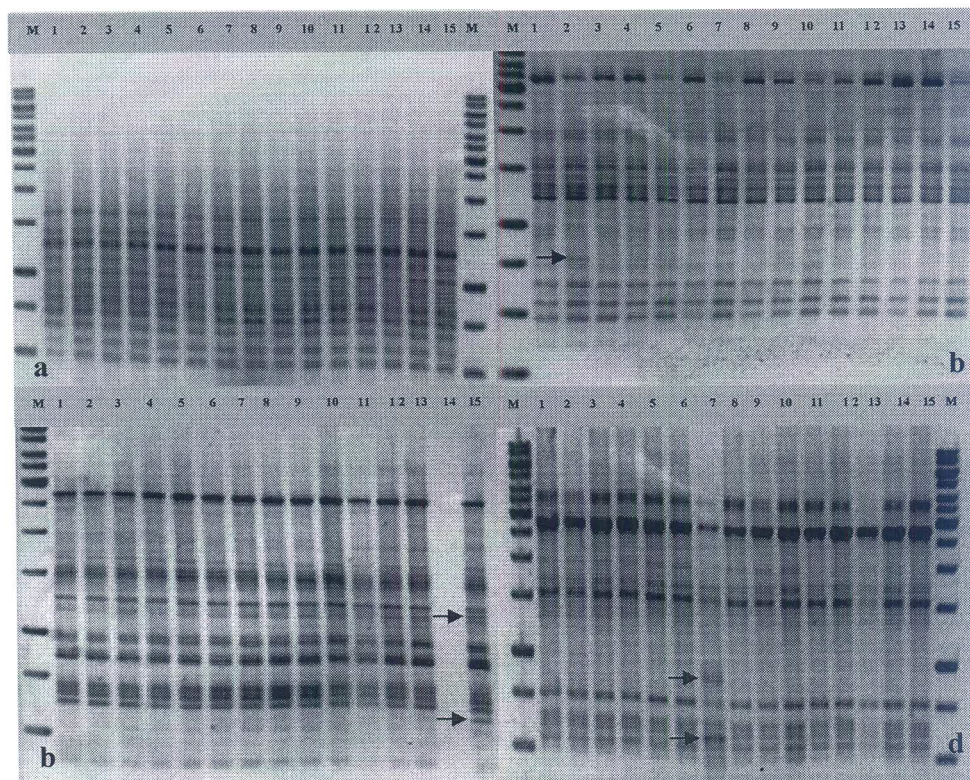
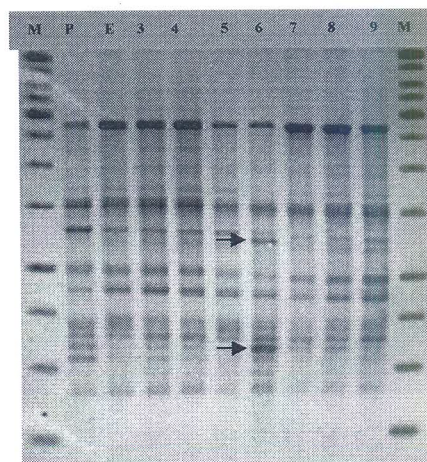


Figura 14. Patrón RAPD obtenidos en muestras crisantemo del control (1-5), LT1 (6-10) y LT2 (11-15) con iniciador 8 (a); con iniciador 1 (b y c); con iniciador 5 (d).

No existió variación en la intensidad de bandas en las muestras que fueron sometidas a las soluciones vitrificadoras antes ni después de la crioconservación.

Figura 15. Patrón RAPD obtenidos en muestras crisantemo del control (3 y 4), LT2 (5 y 6) y LT1 (7-9) con iniciador con iniciador ROTH-1 que habían mostrado anomalías en la intensidad de bandas (P, variedad Puma; E, Variedad Eleonora).



VI. DISCUSIÓN

6. 1 Crioconservación de crisantemo no transgénico en precultivo con sacarosa

La crioconservación de crisantemo se ha logrado por diferentes protocolos. El rango de sobrevivencia varía de 9.4 a 100 % (Fukai 1990; Fukai *et. al.*, 1991, 1994; Hitmi *et al.*, 1997, 2000; Halmagyi *et. al.*, 2004 y Martín y González-Benito 2005), considerando que son variedades diferentes a Indianápolis. Con ésta variedad se obtuvo 36 % de sobrevivencia en precultivo con sacarosa (protocolo de crioconservación mejorado).

Se ha demostrado que la resistencia al congelamiento depende de la suceptibilidad de las variedades al frío y su capacidad de regeneración (Fukai *et al.*, 1991). La variedad Indianápolis es muy sensible a las bajas temperaturas que se presentan en el área de influencia de Chapingo. Durante la estación fría, la planta no forma botones florales, y si lo hace, la floración se retrasa. Aún en condiciones de invernadero, en esta estación del año, la apertura floral también es afectada, y los pétalos de las flores muestran un color rosáceo, como consecuencia del daño por frío que se llega a presentar en el invernadero. La coloración rosácea es transitoria, revirtiéndose el efecto cuando incrementa la temperatura.

6.1.1 Efecto de las soluciones vitrificadoras y la sacarosa en el control

Entre las soluciones vitrificadoras evaluadas, la PVS2 mostró un mayor incremento en la tolerancia a la deshidratación osmótica y al congelamiento, como se ha reportado en la crioconservación de ápices de *Conostylis sp.* y *Anigozanthos sp.* (Turner *et al.*, 2001). Este resultado se relaciona con los crioprotectores del que está constituida la PVS2; penetrantes como el DMSO (Finkle *et. al.*, 1985) y no penetrantes tales como la sacarosa, glicerol y polietilenglicol (Meryman y Williams, 1985), que actúan principalmente fuera de la célula. Es posible que el efecto tóxico de la PVS2 mostrada después de los 40 min de deshidratación sea debido al DMSO, más que por la acumulación de sacarosa (Finkle y Ulrich, 1979). En caso de la PVS3, es posible que no haya proporcionado protección de la célula por dentro, ya que en su composición

(sacarosa 50 % y glicerol 50 %) (Nishizawa *et.al.*, 1993), no se encuentra presente algún crioprotector que penetre la célula, sin embargo, la sobrevivencia mostrada es atribuida principalmente por la sacarosa, ya que se ha encontrado que la sacarosa también es capaz de penetrar las células, dependiendo de la duración del pretratamiento y la temperatura (Meryman y Williams, 1985; Finkle *et. al.*, 1985). Conforme se fueron deshidratando las células, el agua fue desplazada por las moléculas de sacarosa, concentrándose a medida que progresó la deshidratación osmótica, hasta alcanzar un óptimo a los 40 min para actuar como crioprotector, ocasionado efectos contraproducentes después de los 50 min.

6.1.2 Las plantas transgénicas que acumulan trehalosa durante la crioconservación

Se han hecho intentos para usar la trehalosa como un crioprotector incrementando el contenido en plantas sobreexpresando genes microbianos que codifican enzimas para la síntesis de trehalosa. La trehalosa puede afectar el desarrollo actuando como una molécula señal en el metabolismo de carbohidratos. En soya, la trehalosa induce actividad sintasa de sacarosa (Müller *et al.*, 1998). En general, la sacarosa y glucosa actúan como moléculas señal en la regulación de la expresión de genes (Koch, 1996).

Los organismos criptobióticos usualmente contienen una alta concentración de disacáridos en estado de desecación, principalmente de trehalosa (Crowe *et al.*, 2002). Estos organismos acumulan niveles de aproximadamente 20 % de su peso seco. Las líneas transgénicas 35S-8 (LT1) y 35S-19 (LT2) y el control (C), acumulan contenidos de trehalosa de 26.1, 107.7 y 19.9 ng/mg de peso fresco de trehalosa respectivamente (Valle-Sandoval *et al.*, 2008).

Se ha demostrado la tolerancia de organismos transgénicos que se les ha incorporado la capacidad de sintetizar trehalosa frente a diversos factores ambientales adversos. En la mayoría de éstos organismos, el principal objetivo ha sido la tolerancia a estrés hídrico (Karim *et al.*, 2007; Stiller *et al.*, 2008;

Chun *et al.*, 2009;). No existen reportes de transgénicos con síntesis de trehalosa con propósitos específicos de crioconservación.

La LT2 mostró los mayores porcentajes de sobrevivencia en comparación con la LT1. Éste hecho se relaciona principalmente con el contenido de trehalosa que acumulan estas dos líneas transgénicas. La LT2 acumula más trehalosa, por tal motivo, parece ser que proporciona mayor protección durante el congelamiento. Cuando se deshidratan los explantes transgénicos con PVS3, incrementa la concentración de sacarosa (que se proporciona en precultivo y por PVS3) y la trehalosa (existente en la célula). Al igual que el control, la LT1 y LT2 alcanzan los mayores porcentajes de sobrevivencia a los 40 minutos de deshidratación osmótica. Después de este tiempo, hay un efecto negativo en la sobrevivencia, siendo más drástica en la LT2, combinándose además con la deshidratación con PVS3, indicando que después de esta concentración, principalmente de trehalosa, ya se manifiesta un efecto deletéreo para la célula. La toxicidad por parte de la PVS2 se manifiesta más tarde que con la PVS3 por efecto de la concentración de DMSO en la célula conforme avanza la deshidratación osmótica.

Comparando el grado de estrés por ultracongelación (-196 °C) a las que se sometieron los explantes transgénicos en este estudio, lo más parecido que se ha experimentado es la tolerancia al frío de -15 °C por 72 h en Alfalfa (Suárez *et al.*, 2009), -4 °C por 6 h en Arabidopsis (Miranda *et al.*, 2007) y en arroz a 4 y 10 °C por 72 h (Garg *et al.*, 2002; Cheol *et al.*, 2003), temperaturas muy elevadas comparado con el NL. En estos estudios, las plantas transgénicas que sintetizan trehalosa soportan el congelamiento, recuperándose posteriormente sin daños necróticos visibles. El crecimiento y recuperación de las plantas transgénicas en este estudio fue más lento que el control, como se reporta también en Arabidopsis (Miranda *et al.*, 2007).

Las observaciones presentadas en este estudio demuestran la capacidad protectora de la trehalosa endógena ante el congelamiento. Prácticamente con la incorporación de los genes de biosíntesis de trehalosa a la variedad Indianápolis, se le está proporcionando tolerancia a bajas temperaturas.

6.2 Superioridad de la trehalosa en medio de precultivo (exógena) en el control

Los azúcares son moléculas de señalización que modulan el crecimiento, desarrollo y respuestas a estrés (Rolland *et al.*, 2006). La estructura de la trehalosa es similar a la sacarosa, por lo que debe actuar como un análogo en el sensado de azúcares (Wingler *et al.*, 2000).

El uso de trehalosa en medio de precultivo a una concentración de 0.3 M incrementó significativamente la sobrevivencia del control (31 % con PVS2 y 47 % con PVS3) en las dos soluciones de vitrificación.

Es posible que con la cantidad de trehalosa probada, el punto de congelamiento haya bajado más allá de -85 °C, como se ha determinado en *Parkia speciosa* mediante estudios calorimétricos (Nadarajan *et al.*, 2008). En esta especie, el tratamiento con trehalosa bajó el punto de congelamiento a -75 °C a una concentración de 0.075 M y -85 °C con 0.15 M. En la misma planta, con 30 minutos de deshidratación con PVS2 se obtuvo la temperatura más baja de transición vítrea (tg) cuando se combinó con 0.15 M de trehalosa (-50.21°C). Cuando la concentración de trehalosa disminuyó a 0.075 M, la tg incremento a -40.22 °C. Estos datos son similares a la obtenida en este estudio. La óptima deshidratación de los ápices del control se obtuvo a los 40 minutos, a concentraciones mayores de trehalosa (0.3 M).

La trehalosa como único protector en medio de precultivo a una concentración de 0.3 M tiene un efecto positivo en la sobrevivencia del material biológico del control probablemente por la concentración de trehalosa (Bachiri *et al.*, 2001) o por la acumulación intracelular de trehalosa inducida por la aplicación exógena de trehalosa, como se ha propuesto por Smith *et al.*, (1994). En *Taxus chinensis*, el tratamiento con trehalosa como crioprotector también incremento la regeneración de células crioconservadas (40 %), mostrando superioridad ante el DMSO y al glicerol (Sangli *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, se produjo el 70 % de sobrevivencia (Bachiri *et al.*, 2001).

Aunque la sobrevivencia del control mejoró con el precultivo en trehalosa, se manifestaron daños en los explantes (más del 85 % después de 7 días de precultivo en la LT2). Ciertos experimentos prueban que a concentraciones en el rango de 0.4 M – 1 M de trehalosa, el daño del material supera el 90 %, disminuyendo drásticamente la sobrevivencia en comparación con otros crioprotectores (Paques *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 2001), descartando a la trehalosa como un crioprotector efectivo en esos trabajos.

La viabilidad de los explantes mostró una disminución considerable después de los 4 días de precultivo. Se observó mayor daño de explantes en presencia de trehalosa que con sacarosa, posiblemente por su efecto moderado de toxicidad a la concentración de 0.3 M en el control. Observaciones ultraestructurales en *Arabidopsis* muestran cambios celulares después del precultivo prolongado, de 1 a 7 días: plasmólisis, microvacuolaciones, numerosas estructuras autofágicas, escasez de ribosomas, incremento en el número y tamaño de granos de almidón (Bachiri *et al.*, 2001). Después de la eliminación de la trehalosa en el medio de precultivo, las plantas recuperaron su velocidad de crecimiento, posiblemente también su organización estructural y número de polisomas como en *Arabidopsis* (Bachiri *et al.*, 2001), sugiriendo una intensa actividad metabólica.

De acuerdo a las evidencias presentadas en otros estudios, al parecer, el límite de la concentración de la trehalosa para que actúe como agente crioprotector es por debajo de 0.3 M, como se mostró en este estudio, tomando en cuenta que el crisantemo es una especie herbácea y sensible a deshidratación osmótica. Posiblemente, la tolerancia a la trehalosa, en especies leñosas o de clima templado, sea mayor.

6.2.1 Efecto negativo de la aplicación exógena de trehalosa en las plantas transgénicas.

La aplicación exógena de trehalosa al material transgénico resultó contraproducente a la concentración probada (0.3 M).

La sobrevivencia en el control incremento por las propiedades crioprotectoras de la trehalosa ya mencionadas. La lógica es que al encontrarse la trehalosa tanto intracelular como extracelularmente, incrementa la protección, dando como resultado mayor sobrevivencia, en acuerdo con Bhandal *et al.* (1985). A la concentración de 0.3 M de trehalosa, en el control es benéfico, pero en el material transgénico, más que conferir tolerancia, les priva la sobrevivencia a medida que transcurre la deshidratación osmótica. La causa principal podría ser que existe mayor concentración (LT2) de trehalosa en la célula que el control. Se ha discutido con anterioridad la toxicidad que presenta a concentraciones mayores a 0.4 M. Es probable que la cantidad de trehalosa que se acumula cuando se deshidratan los tejidos con las soluciones de vitrificación a más de 20 minutos rebasa un umbral intracelular crítico.

La mayor mortalidad de los explantes se obtuvo para la LT2, atribuido por acumular más cantidad de trehalosa endógenamente que la LT1 y el control. Ante este resultado, optamos por bajar la concentración de trehalosa y combinarlo con sacarosa a la mitad de la concentración de cada una, teniendo una concentración final de 0.3 M en el medio de precultivo.

6.3 Incremento de la sobrevivencia de las plantas transgénicas mediante el efecto combinado de trehalosa y sacarosa en precultivo

El desarrollo de procedimientos óptimos para el almacenamiento a largo plazo se ha realizado adicionando varias mezclas y concentración de crioprotectores así como duración de deshidratación osmótica en precultivo antes del enfriamiento.

Como se observó, a esta concentración se obtuvieron los mejores porcentajes de sobrevivencia después del congelamiento de las transgénicas en NL, aún con concentraciones similares de contenido de trehalosa de la LT1 (26.1 ng/mg de peso fresco) y el control (20 ng/mg de peso fresco). En *Arabidopsis* también se ha observado incremento en la tolerancia a estrés aún a niveles bajos de trehalosa, inferior a la que puede encontrarse en plantas tolerantes a la desecación de forma natural (Karim *et al.*, 2007). Por eso, se ha

sugerido que la trehalosa no mejora la tolerancia al estrés en plantas transgénicas, sino su efecto ó el intermediario Trehalosa-6-Fosfato en la señalización de azúcares y la expresión de genes relacionados al estrés (Schluepmann *et al.*, 2003; Ramón *et al.*, 2007). Sin embargo, aún no se conocen las señales precisas y mecanismos de mejoramiento a la tolerancia al estrés.

El control no mejoró la sobrevivencia a la observada en sólo trehalosa como crioprotector. Se ha visto que la combinación de trehalosa (10 o 20 %) con DMSO 0.15 M incrementa la sobrevivencia, siempre y cuando existan pretratamientos (Bhandal *et al.*, 1985). Estudios previos con crisantemo demuestran que una combinación de crioprotectores es más eficiente para mantener la viabilidad después del congelamiento que uno solo (Hitmi *et al.*, 1997).

Existen varios reportes en la comparación de crioprotectores en la etapa de precultivo, tales como sacarosa, fructosa, glucosa, rafinosa, sorbitol, polialcoholes (rabitol y eritritol), glicerol, inosinol, polietilen glicol, dimetil sulfóxido y trehalosa (Suk *et al.*, 2007), en donde la sacarosa es la que proporciona mayor sobrevivencia del material biológico. Pocos estudios muestran la superioridad de la trehalosa contra sacarosa en plantas. En estos reportes, se ha encontrado que la concentración óptima de trehalosa es alrededor de 0.17 M, como se demostró en éste estudio con una concentración de 0.15 M (solo que combinado con sacarosa 0.15 M).

Las plantas transgénicas incrementaron significativamente la sobrevivencia comparado con el control (que también tuvo un ligero incremento en comparación a precultivo en sacarosa): 71 %, 63 % y 45.3 % para LT2, LT1 y control, respectivamente. Estos valores se lograron gracias al precultivo en trehalosa combinada con sacarosa, que permitió la protección de las células desde el medio extracelular. Como lo indica Bhandal *et al.*, (1985), en la crioconservación de zanahoria y tabaco, es necesario que exista un precultivo de trehalosa a más baja concentración antes del congelamiento, de lo contrario, las células no sobreviven. En levaduras se ha mostrado que para la

estabilización de las membranas se requiere que la trehalosa se encuentre en ambos lados (Crowe *et al.*, 1998), lograda por el transporte de trehalosa al interior de célula. En este trabajo, se puede pensar que la trehalosa fué transportada hacia el interior celular mediante los transportadores de sacarosa (SUC1 y SUC2) que se activaron durante el precultivo, incrementándose de esta forma la cantidad de trehalosa existente intracelularmente sin causar efectos tóxicos o inhibiendo parte de la absorción de trehalosa (Wingler *et al.*, 2000).

6.3.1 Transporte de trehalosa

Se han documentado varios mecanismos de transporte de sacarosa en mamíferos y procariontes (Boos *et al.*, 1990), pero en plantas el estudio del transporte de la trehalosa ha sido muy poco.

En *Escherichia coli*, hay dos sistemas de absorción de trehalosa, usados de acuerdo a la osmolaridad del medio. Bajo condiciones de alta osmolaridad, la trehalosa es hidrolizada por la trehalasa periplásmica a glucosa, la cual es absorbida por la enzima II de la PTS (carbohydrate phosphoenoltransferase system) específica para glucosa (Boos *et al.*, 1990). A baja osmolaridad, la trehalosa se absorbe por el uso de la enzima II^{Tre}, dependiente de PTS (Klein *et al.*, 1995).

Los transportadores de azúcares se localizan en posiciones estratégicas en todas las vías metabólicas, por esto existe un mecanismo regulatorio para el control de la absorción y la expulsión directamente. Considerando que la célula tiene un espectro de acarreadores de afinidad variada y capacidad de azúcares, los sensores extracelulares pueden ajustar la absorción de azúcar para los requerimientos, por ejemplo, induciendo sistemas de absorción de alta afinidad a baja concentración. Estos sistemas de transporte intercelular son más complicados en plantas superiores porque al menos dos actividades (de exporte e importe) están integrados. Se conoce poco los mecanismos moleculares involucrados en el sensado (reconocimiento) de azúcares en relación al transporte en plantas superiores (Wingler *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis* la sacarosa induce rápidamente la expresión de trehalosa fosfato sintasa a altos niveles. Adicionando sacarosa lleva a un incremento progresivo en la concentración de trehalosa-6-fosfato (T6P), sugiriendo que el control de T6P sobre la utilización del carbono está relacionado al carbono disponibles para el crecimiento. La T6P correlaciona con la expresión de un conjunto de genes específicos independientemente del estado del carbono. Sin embargo, la adición de sacarosa reprime 15 de estos genes (Schluepmann *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que la trehalosa interfiere con el exporte (distribución) de asimilados en forma de sacarosa a los sitios de crecimiento. En *Arabidopsis* se han expresado transportadores de sacarosa (SUC1 y 2). La expresión de SUC2 se redujo por el crecimiento de las plantas en manitol, mientras que en trehalosa 25 mM o en sacarosa 25 mM indujeron ligeramente la expresión (Wingler *et al.*, 2000), indicando que, probablemente, los transportadores de sacarosa también son utilizados por la trehalosa para ingresar a la célula.

Se ha especulado que la trehalosa es un potente activador de las vías de señalización de la sacarosa o, que las vías de señalización de sacarosa y trehalosa son, al menos parcialmente diferentes. La β -amilasa se induce por azúcares (Datta *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, la sacarosa indujo fuertemente la β -amilasa, pero no se detectó la inducción por trehalosa. Sin embargo, la trehalosa incrementó el efecto de la sacarosa en la expresión de β -amilasa de una manera dependiente de la concentración. Dada la ausencia de inducción de la trehalosa sola, es posible que la sacarosa y trehalosa activen sinérgicamente la expresión de β -amilasa (Wingler *et al.*, 2000).

Las plantas recuperadas de la combinación de sacarosa más trehalosa exhibieron una regeneración normal en comparación con el control, por lo que el efecto negativo de la trehalosa es reversible, como se reporta en *Arabidopsis* con la adición de sacarosa al medio con trehalosa (Wingler *et al.*, 2000). En este estudio, la aplicación exógena de trehalosa redujo la velocidad de crecimiento de los regenerantes, pero al suministrar una fuente de carbono en forma de azúcar metabolizable (sacarosa) anuló el efecto negativo causado por

la trehalosa (aunque se usó a la mitad de la concentración), como ha sido encontrado también por Wingler *et al.* (2000) y Schluepmann *et al.* (2004).

Este es el primer reporte en la crioconservación de organismos transgénicos en plantas con síntesis de trehalosa que combina la sacarosa y trehalosa en medio de precultivo como crioprotectores.

6. 4 Estabilidad genética de las plantas crioconservadas

Para el análisis RAPD se tomaron muestras subsecuentemente a través de todo el proceso de crioconservación, para detectar a qué etapa se puede producir la alteración genética.

La crioconservación y almacenamiento en frío son dos de las principales técnicas para crioconservar una gran colección de accesiones (Peredo *et al.*, 2008). Es de vital importancia evaluar la estabilidad genética y epigenética del material recuperado para poder determinar el éxito de un protocolo (Harding *et al.*, 2006). Ambas técnicas involucran la manipulación *in vitro* de los tejidos almacenados, lo cual es considerado un riesgo potencial de generación de inestabilidad genética, como se ha demostrado en *Humulus lupulus* (Peredo *et al.*, 2008).

Para evaluar la estabilidad genética se han empleado varias técnicas de marcadores moleculares, como los RAPD, preferido por el análisis masivo del genoma. Numerosos estudios indican que las plantas recuperadas de la crioconservación no presentan alteraciones genéticas (Hao *et al.*, 2001; Peredo *et al.*, 2008), mientras que en papaya (Kaity *et al.*, 2008) y crisantemo (Fukai *et al.*, 1994; Martín y González-Benito, 2005) se ha detectado variación somaclonal en plantas crioconservadas, atribuido a al cultivo *in vitro* y la naturaleza quimérica del crisantemo. En este estudio, no se detectaron variaciones en ninguna planta recuperada después de la crioconservación, sólo modificaciones en la intensidad de bandas en la LT2 procedente de la etapa de propagación *in vitro* (también se manifestó cambios en intensidad de bandas en la planta control y la LT1, pero esto no fue repetible).

El cultivo de tejidos puede promover fenómenos mutacionales inducido por la imposición de condiciones de estrés (Linacero *et al.*, 2000), que puede resultar en la pérdida programada de controles celulares (Phillips *et al.*, 1994; Kaeppler *et al.*, 1998). La técnica RAPD detectó cambios en intensidad de bandas en plantas sometidas a propagación por cultivo de tejidos y en la etapa de precultivo, reflejando el estrés sufrido por los explantes por estrés osmótico o por la activación de transposones en respuesta al estrés impuesta en el medio de cultivo (Hirochika *et al.*, 1996), sin embargo, no se demostró en qué condiciones de precultivo (si fue con sacarosa, trehalosa o la combinación de ambas) que se indujo la variación.

Estudios realizados en variedades de crisantemo muestran un alto nivel de variabilidad genética con RAPD, demostrando que depende de la variedad (Martín *et al.*, 2002), con una frecuencia de variación en un rango de 0 % (de 1115 marcadores) a 18.8 % (220 cambios detectados en 1209 marcadores) (Martín *et al.*, 2002), sugiriendo la existencia de partes sensibles a mutación en el genoma (Al-Zahim *et al.*, 1999). Probablemente, Indianápolis sea de las variedades que no presentan variación somaclonal, o la frecuencia es muy bajo, ya que la variación detectada y repetible en la LT2 puede o no ser considerado como una modificación genética (representa el 0.03 % de variación), incluso nula si se considera la planta control, sin la influencia del transgén. La variación observada en la LT2 fue detectada sólo con un iniciador, los demás iniciadores no fueron capaces de detectarlo, además de que no se repitió incluso con el mismo iniciador.

Estos resultados también estarían indicando que el procedimiento de micropropagación aquí empleado es conveniente en cuanto a que no produce variación somaclonal apreciable o detectable mediante marcadores RAPDs. Es posible que empleando más iniciadores para amplificar una mayor cantidad de *loci*, pudieran detectarse algunas variantes debidas al cultivo *in vitro* y/o la crioconservación.

Se sugiere que la heterogeneidad de los explantes es la principal razón de las diferencias en la variación de los cultivares, clones y diferentes explantes de la misma planta (Reuveni *et al.*, 1996). Por eso, la estabilidad genética de los individuos a través del cultivo *in vitro* pueden depender de la célula o células del explante original. A esta variación se le debe adicionar las alteraciones inducidas por condiciones de estrés de cultivo *in vitro*. La existencia del quimerismo periclinal en crisantemo ha sido previamente reportado y se le ha relacionado a la variación de la estabilidad detectada en estos cultivares (Dowrick y El-Bayoumi, 1965; Wolff, 1996; Martín *et al.*, 2002). Como se ha visto por Khalid *et al.*, (1989), además del quimerismo, la mutación de genes y cambios en el cromosoma son considerados como posibles causas de la variación somaclonal en crisantemo. Fukai *et al.* (1994), demostró que la estructura quimérica del domo apical de crisantemo no se conserva en el protocolo de crioconservación, sino que la estructura periclinal es destruida durante los procesos de crioconservación, además de que el color de la flor de las regenerantes también cambió.

Aunque no se evaluó la estabilidad bioquímica, es probable que la capacidad de síntesis de trehalosa en las plantas transgénicas no se haya alterado por la crioconservación, como se ha reportado por Hitmi *et al.* (2000), en la crioconservación de ápices de *C. cinerariaefolium*, en donde la capacidad de biosíntesis de piretrinas no se alteró después de la crioconservación, revelando que en las células descongeladas no hay alteración morfogénica, vías de biosíntesis de corofila y de piretrinas (Hitmi *et al.*, 2000). Sin embargo, células en suspensión de la misma especie, Hitmi *et al.* (1997) encontró un bajo contenido de clorofila y mayor capacidad de biosíntesis de piretrinas después de la crioconservación. Las causas a que se le atribuyó a la alteración fue: células en etapas particulares de su ciclo y nivel de ploidía (Wither, 1978), que el tratamiento criogénico induce efecto de “shock por frío” para la actividad bioquímica (Brandts, 1967) y la ultraestructura celular (Finkle *et al.*, 1985). Esto sugiere que posiblemente en las células hay más efectos bioquímicos que en órganos de las plantas.

La estabilidad epigenética no se estudio, pero es probable que hayan ocurrido cambios en la metilación del ADN, como se reporta en manzana mediante MSAP (Hao *et al*, 2001). En *Humulus lupulus* se encontraron eventos de demetilación, comunes en aquellas plantas sometidas a frío y a la crioconservación, indicando el posible efecto de los procesos de establecimiento *in vitro*, una etapa esencial en ambos protocolos (Peredo *et al.*, 2008). También se detectaron patrones específicos de metilación en cada protocolo, indicando que ambos métodos producen cambios epigenéticos en plantas seguido del almacenamiento en frío y crioconservación (Peredo *et al.*, 2008). Kaity *et al.*, (2008) en papaya, mediante vitrificación mostraron varios niveles de modificaciones de metilación (0.52-6.62 %), y que la variabilidad depende del genotipo.

Es conveniente utilizar otro tipo de marcador para confirmar las estabilidad genética de las plantas crioconservadas, como AFLP, ya que los RAPD se enfoca a fragmentos de tamaño relativamente grandes (300-3000 pb) y los AFLP en tamaños pequeños (100-500 pb) (Peredo *et al.*, 2008) y evitar los problemas de ADN comigrantes que presenta los RAPDs además de su baja repetibilidad (Peredo *et al.*, 2008).

VII. CONCLUSIONES

La protección de la trehalosa tanto extracelular como intracelular mejoró la sobrevivencia de los ápices durante el congelamiento. La biosíntesis de trehalosa en las plantas transgénicas de crisantemo proporcionó mayor tolerancia al congelamiento de los ápices que la línea no transgénica, demostrando las propiedades crioprotectoras que posee este disacárido.

El procedimiento de crioconservación por vitrificación no alteró la estabilidad genética de las plantas después de 45 días de su recuperación analizadas por el método RAPD, confirmando que el protocolo de crioconservación empleado asegura la identidad genética del germoplasma.

VIII. PERSPECTIVAS

Las concentraciones de trehalosa aquí probadas muestran una buena protección durante el congelamiento, pero es necesario evaluar concentraciones por abajo y arriba de las ya descritas en este estudio, con el propósito de determinar umbrales críticos y favorables de sobrevivencia en el caso del crisantemo 'Indianápolis'.

La mayor sobrevivencia obtenida con la combinación de trehalosa más sacarosa puede suponer la entrada de trehalosa mediante los transportadores de sacarosa; en este estudio no se evaluó, pero es necesario comprobar esta hipótesis. Para este caso se puede realizar un estudio en donde, se adicionen éstos disacáridos por separado y combinados, detectar el gen de los transportadores de sacarosa por RT-PCR y evaluar su presencia en los experimentos antes mencionado.

El material vegetal de este trabajo consistió de plantas transgénicas con el promotor CaMV35S, que expresan el gen de trehalosa de forma constitutiva; sería interesante estudiar el efecto en plantas transgénicas con el mismo gen de trehalosa con el promotor *RD29A*, de expresión inducible (por salinidad,

calor o frío) y con otras líneas transgénicas de las que también se cuenta en nuestro grupo de trabajo.

Alternativamente, se puede determinar el grado de protección de la trehalosa durante el congelamiento mediante estudios calorimétricos, para determinar los cambios de fase de la solución de trehalosa caracterizar aún mejor las propiedades de protección de este disacárido a diversas concentraciones por medio de los eventos termofísicos que se presenten.

En lo que respecta a la parte molecular, es necesario confirmar la estabilidad genética de las plantas crioconservadas por otros métodos más confiables y menos problemáticas que los RAPD (por ejemplo RFLP o AFLP), aunque el costo económico se incremente. Lo anterior es en lo que se refiere a los cambios genéticos, sin embargo, también es necesario el análisis epigenético del material regenerado, lo cual podría ser mediante MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn Y. H.; Sakai A. 1994. Survival by vitrification of *Dendranthema grandiflorum* L. shoot tips for cryopreservation. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 35(5):499-506.
- Almeida, A. M.; Villalobos, E.; Araújo, S. S.; Cardoso, L. A.; Santos, D. M.; Santos, M. A.; Fevereiro, P. S.; Torné, J. M. 2007. Electroporation of maize embryogenic calli with the trehalose-6-phosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana*. Acta Physiologiae Plantarum 29(3): 273-281.
- Al-Zahim M. A.; Ford-Lloyd B. V.; Newbury H. J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Rep 18:473–477.
- Avonce N.; Leyman B.; Mascorro-Gallardo J.; Van Dijck P. A.; Thevelin J. M.; Iturriaga G. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1* genes is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. Plant Physiol. 136:3649-3659.
- Bachiri Y.; Bajon C.; Sauvanet A.; Gazeau, C.; Morisset C. 2001. Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension cells. Protoplasma 214 (3/4): 227-243.
- Bae H.; Herman E.; Bailey B.; Bae H. J.; Sicher R. 2005. Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. Physiologia Plantarum 125: 114–126.
- Bell W.; Sun W.; Hohmann S.; Wera S.; Reinders A.; Virgilio C. D.; Wiemken A.; Thevelein J. A. 1998. Compositional and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose complex. J. Biol. Chem. 273:33311–33319.
- Benson E. E. 1999. Cryopreservation. In: Plant Conservation Biotechnology. E. E. Benson (Ed). University of Abertay, Dundee UK. Pp. 83-95.
- Bhandal I. S.; Hauptmann R. M.; Widholml J. M. 1985. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. Plant Physiology 78:430-432.

- Bianchi G, Gamba A, Limiroli R, Pozzi N, Elster R, Salamini F, Bartels D . 1993. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiol Plant* 87:223–226
- Biswas M. K.; Dutt M.; Roy U. K.; Islam R.; Hossain M. 2009. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 122:409–416.
- Blázquez M. A.; Santos E.; Flores C.; Martínez-Zapater J. M.; Salinas J.; Gancedo C. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal* 13:685–689.
- Brandts J. F. 1967. Heat effects on proteins and enzymes. In: Rose A. H. (ed) *Thermobiology*. Academic Press, New York, pp 25-72.
- Boos, W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, and P. Postma. 1990. Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:3450–3461.
- Cheol J. i.; Jun O. S.; Seok S. J.; Bin C. B.; Sanglk S.; Ho K. C.; Shic K. Y.; Soo S. H.; Do C. Y.; Hie N. B.; Kon K. J. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* 131(2):516-524.
- Chun L. Y.; Xiao W.; Li C. H.; Rong M. F.; Lei C.; Jun Y. 2009. Obtaining of transgenic wheat plants with *TPSP* fusion gene and a preliminary assay of their drought tolerance. *Journal of Triticeae Crops* 29(2): 195-198.
- Clegg J. S.; Drost-Hansen W. 1990. On the biochemistry and cell physiology of water, in: P.W. Hochachka, T.P. Mommsen (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1–23.
- Cortina C.; Culiáñez-Maciá. F. A. 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169:75–82.
- Crowe J. H.; Crowe L. M.; Carpenter J. F.; Wistrom A. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242:1–10.
- Crowe J. H.; Hoekstra F. A.; Crowe L. M. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review Physiology* 54:579-599.

- Crowe J. H.; Carpenter J. F.; Crowe L. M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review Physiology* 60:73–103.
- Crowe J. H.; Crowe L. M. 2000. Preservation of mammalian cells—learning nature's tricks. *Nat. Biotechnol.* 18:145–146.
- Crowe J. H.; Crowe L. M.; Prestrelski S.; Hoekstra F. A.; Araujo P. D.; Panek A. D. 1997. Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration, in: W.H. Dantzler (Ed.), *Handbook of Physiology*, Oxford University Press, New York, NY, pp. 1445–1477.
- Datta R.; Vally K. J. M.; Sharma R. 1999. Sugar mimics the light-mediated α -amylase induction and distribution in maize and pearl millet leaves. *J Plant Physiol* 154:665–672.
- Dellaporta S.L.; Wood J; Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Dowrick G.J.; El-Bayoumi A. 1965. The origin of new forms of the garden *Chrysanthemum*. *Euphytica* 15: 32–38.
- Du L. P.; Xu H. J.; Ye X. G.; Lin Z. P. 2007. Transgenic wheat plants with TPS gene and identification of their functions. *Journal of Triticeae Crops* 27(3):369-373.
- Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C., Graham, I.A. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant Journal* 29: 225-235.
- Elliott G. d.; Xiang H. L.; Cusick J. L.; Menze M.; Vincent J.; Witt T.; Hand S.; Toner M. 2006. Trehalose uptake through P2X7 purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology* 52:114–127.
- Elbein, A.D. 1974. The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227–256.
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann F. 1997a. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Horticulturae* 447: 471- 475.

- Engelmann F. 1997b. *In vitro* conservation methods. In: Biotechnology and plant genetic resources. J. A. Callow, B. V. Ford-Lloyd and H. J. Newbury (Eds.). CAB International pp. 119- 161.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and Prospects. *In vitro* cellular and development biology-plant 40(5):427-433.
- Eroglu A.; Russo M. J.; Bieganski R.; Fowler A.; Cheley S.; Bayley H.; Toner M. 2000. Intracellular trehalosa improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology* 18:163-167.
- Evans D. A.; Sharp W. R.; Medina-Filho H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* 71(6):759–774.
- Finkle B. J.; Ulrich J. M. 1979. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiology* 63:598-604.
- Finkle B. J.; Zavala M. E.; Ulrich J. M. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. In: *Cryopreservation of plant cells and organs*. K. K. Kartha (Ed). CRC Press. Boca Raton, Florida pp. 75-113.
- Fukai S. 1990. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. *Scientia Horticulturae* 45:167-174.
- Fukai S.; Oe M. 1990. Morphological observations of chrysanthemum shoot tips cultured after cryoprotection and freezing. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 59(2):383-387.
- Fukai S.; Goi M.; Tanaka M. 1991. Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. *Euphytica* 54:201-204.
- Fukai S.; Goi M.; Tanaka M. 1994. The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Scientia Horticulturae* 57(4): 347-351.
- Fukai S.; Nagira T.; Goi M. 2000. Cross compatibility between chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) and *Dendranthema* species native to Japan. *Acta Horticulturae* 508: 337-340.
- Fukai S. 2003. *Dendranthema* species as chrysanthemum genetic resources. *Acta Horticulturae* 620: 223-240.
- Gaafar R. M.; Saker M. M. 2006. Monitoring of cultivars identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt. *World J. Agric. Sci.* 2 (1):29–36.

- Garg, A. K.; Kim JuKon; Owens, T. G.; Ranwala, A. P.; Choi YangDo; Kochian, L. V.; Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25): 5898-15903.
- Godging J. M.; Van Dun K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Science* 4:315-319.
- Göldner, E. M.; Seitz, V.; Reinhard, E. 1991. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cultures: preculture and freeze tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2(1)19-24.
- Gonzalez-Arnan M. T.; Engelmann F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study of sugarcane. *Cryoletters* 27(3):155-168.
- Guo N.; Puhlev I.; Brown D. R.; Mansbridge J.; Levine F. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat. Biotechnol.* 18: 168–171.
- Halmagyi A.; Fischer-Klüver G.; Mix-Wagner G. 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Reports* 22: 371-375.
- Han S.; Park S. R.; Kwon H. B.; Yi B. Y.; Lee G. B.; Byun M. O. 2005. Genetic engineering of drought-resistant tobacco plants by introducing the trehalose phosphorylase (TP) gene from *Pleurotus sajor-caju*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82:151–158.
- Hao Y. J.; Liu Q. L.; Deng X. X. 2001. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal and molecular levels. *Cryobiology* 43:46–51.
- Hao Y. J.; Wen X. P.; Deng X. X. 2004. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow- growth culture. *J Plant Physiol* 161:479-84.
- Harding K. 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 37(1).
- Harding K. 1997. Stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from cryo- preservation. *Cryo-Letters* 18:217–230.
- Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cell: a review. *Cryoletters* 25:3–22.

- Harding K.; Muller J.; Timmermann H.; Lorenz M.; Friedl T.; Day J. G. 2006. Growth and amplified fragment length polymorphism analysis of *Euglena gracilis* after cryopreservation by alginate encapsulation dehydration. *Cryobiology* 53:367–446.
- Hee A. Y. 2005. Cryopreservation of axillary buds of *Dendranthema grandiflorum* Ramat. and subsequent plant regeneration. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 36(4):540-547.
- Hirochika H.; Sugimoto K.; Otsuki Y.; Tsugawa H.; Kanda M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 93:7783–7788.
- Hitmi A.; Sallanon H.; Barthomeuf C. 1997. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. Cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability. *Plant Cell Reports* 17: 60-64.
- Hitmi A.; Barthomeuf C.; Sallanon H. 1999. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *Cryo-letters* 20(2):113-120.
- Hitmi A.; Coundret A.; Barthomeuf C. and Sallanon H. 2000. Role of intracellular water retention strength in freezing tolerance of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cell cultures. *Journal of Plant Physiology* 157: 47-53.
- Infante G.; Zárate S. 1984. *Métodos Estadísticos*. Editorial Trillas 643 pp.
- Iturriaga G.; Gaff D. F.; Zentella R. 2000. New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Aust. J. Bot.* 48:153–158 (2000).
- Iwaya-Inoue M.; Takata, M. 2001. Trehalose plus chloranphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *HortSci.* 36: 946-950.
- Kaeppler S. M.; Phillips R. L. 1993. Tissue culture induced DNA methylation variation in Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(19):8773–8776.
- Kaeppler S. M.; Phillips R. L.; Olhoft P. 1998. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In: S.M. Jain, P.S. Brar y D.S. Ahloowalia (Eds.), *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, pp. 465–484. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Kaeppler S. M.; Kaeppler H.; Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant. Mol. Biol.* 43:179 –88.

- Kaity A.; Ashmore S.; Drew R. A.; Dulloo M. E. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports* 27:1529–1539.
- Karim S.; Aronsson H.; Ericson H.; Pirhonen M.; Leyman .; Welin B.; Mäntylä E.; Palva E. T.; Van Dijck P.; Holmström K. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol Biol* 64:371–386.
- Kartha K. K. 1987. Advances in the cryopreservation technology of plant cell and organs. In: C. E. Geen, D. A. Somers, W. P. Hackett and D. D. Bioesboer (Ed.), *Plant tissue and cell culture*. Alan R. Liss, New York, pp. 447-458.
- Khalid N.; Davey M. R.; Power J. B. 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Scientia Horticulturae* 38:287–294.
- Kikawada T.; Saito A.; Kanamori Y.; Nakahara Y.; Iwata K.; Tanaka D.; Watanabe M.; Okuda T. 2007. Molecular cloning and characterization of a facilitated trehalose transporter, TRET1. *Cryobiology* 55:324–378.
- Klein W.; Horlacher R.; Boos W. 1995. Molecular analysis of *treB* encoding the *Escherichia coli* enzyme II specific for trehalose. *J. Bacteriol.* 177:4043–4052.
- Koch K. E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:509–540.
- Lalonde S.; Boles E.; Hellmann H.; Barker L.; Patrick J. W.; Frommer W. B.; Ward J. M. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant. Cell.* 11:707–726.
- Langis R; Schnabel B.; Earle E. D.; Steponkus P. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. suspension by vitrification. *Cryoletter* 10 (6):421-428.
- Larkin P. J.; Scowcroft W. R. 1988. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197– 214.
- Leyman B.; Van Dijck P.; Thevelein J. M. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant. Sci.* 6:510–513.

- Linacero R.; Alves E. F.; Vázquez A. M. 2000. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theor. Appl. Genet.* 100:506–511.
- Mandal B. B. 1997. Application of *in vitro*/cryopreservation techniques in conservation of horticultural crop germplasm. *Acta Horticulturae* 447:483–489.
- Martín C.; Uberhuaga E.; Pérez C. 2002. Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127:247–253.
- Martín C.; González-Benito E. 2005. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot after cryopreservation by vitrification and encapsulation–dehydration. *Cryobiology* 51:281–289.
- Martín C.; González-Benito M. E. 2006. Sequence comparison in somaclonal variant of cryopreserved *Dendranthema grandiflora* shoot apices. *Cryobiology* 53:367–446.
- Martin C.; González-Benito M. E. 2009. Cryopreservation and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev *in vitro* cultures. *Agricultural and Food Science* 18(2):129-135.
- Mascorro-Gallardo J. O.; Avonce N.; Iturriaga G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2):193-202.
- Matsumoto T.; Sakai A.; Yamada K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13: 442-446.
- Meryman N. T.; Williams R. J. 1985. Basic principles of freezing injury in plant cells; natural tolerance and approaches to cryopreservation. In: Kartha K. K. (Ed), *Cryopreservation of plant cells and organs*. Pp. 13-48, Florida: CRC press.
- Miranda J. A.; Avonce N.; Suárez R.; Thevelein J. M.; Van Dijck P.; Iturriaga G. 2007. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226:1411-1421.
- Müller J.; Boller T.; Wiemken A. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *J. Plant. Physiol.* 153:255–257.

- Murashige T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Nadarajan J.; Mansor, M.; Krishnapillay, B.; Staines, H. J.; Benson, E. E.; Harding, K. 2008. Applications of differential scanning calorimetry in developing cryopreservation strategies for *Parkia speciosa*, a tropical tree producing recalcitrant seeds. *CryoLetters* 29(2): 95-110.
- Niino T.; Seguel I.; Murayama T. 2000. Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. H. Takagi and F. Engelmann (Eds.). IPGR. Rome, Italy. Pp. 194-199.
- 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* 91:67-73.
- Oliver A. E.; Crowe L. M.; Crowe J. H. 1998. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Sci. Res.* 8:211-221.
- Otuba M.; Iwaya-Inoue M. 2000. Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *Hort science* 35:1107-1110.
- Paques, M.; Poissonnier, M.; Dumas, E.; Monod, V. 1997. Cryopreservation of dormant and non-dormant broad-leaved trees. *Acta Horticulturae*: 491-497.
- Panis B.; Swennen R.; Engelmann F. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticulturae* 560: 79-85.
- Panis B.; Lambardi M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology, Villa Gualino, Turin, Italy.
- Patist A.; Zerb H. 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 40:107-113.
- Patzak, J. 2003. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica* 131: 43-50.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhureea, D.; Zhang, Y. 2007. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-41.
- Peredo E. L.; Arroyo-García R.; Reed B. M.; Revilla M. A. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57:234-241.

- Pereira C. S.; Lins R. D.; Chandrasekhar I.; Freitas L. G.; Hünenberger. 2004. Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal* 86:2273–2285.
- Peschke V. M.; Phillips R. L. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Adv. Genet.* 30:41–75.
- Phillips R. L.; Kaeppler S. M.; Olhoft P. 1994. Genetic in-stability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 91:5222–5226.
- Puhlev I.; Guo N.; Brown D. R.; Levine F. 2001. Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology* 42: 207–217.
- Rajapakse N. C.; Miller W. B.; Nelly J. W. 1996. Low temperature storage of rooted chrysanthemum cuttings: relationship to carbohydrate status of cultivars. *Jornal American Society Horticulturae Science.* 121: 740-745.
- Rahman M. H; Rajora O. P. 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Rep* 20:531–536.
- Ramon M.; Rolland F.; Thevelein J. M.; Van Dijck P.; Leyman B. 2007. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol Biol* 63:195–206.
- Rao N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology.* 3 (2): 136-145.
- Reinhoud P. J.; Iren F. V.; Kijne W. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm.* H. Takagi and F. Engelmann (Eds.). IPGR. Rome, Italy. Pp. 91-102.
- Reuveni O.; Israeli Y.; Lahav E. 1996. Somaclonal variation in Banana and Plantain. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 36. Somaclonal variation in crop improvement II., pp. 174–196. Springer-Verlag, Berlin.
- Rival, A., Bertrand, L., Beule, T., 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm. *Plant Breed* 117, 73–76.
- Rolland F.; Baena-González E.; Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57:675–709.

- Rout, G.R.; Mohapatra, A. 2006. Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. *Eur. J. Hortic. Sci.* 71:53–68.
- Roxas N. J. L.; Tashiro Y.; Miyazaki S.; Isshiki S.; Takeshita A. 1995. *In vitro* propagation of higo chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.). *Jornal Japan Society Horticulturae Science.* 63: 863-870.
- SAGARPA. 2005. Anuario estadístico. www.sagarpa.gob.mx.
- SAGARPA. 2006. Anuario estadístico. www.sagarpa.gob.mx.
- 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* 9:30–33.
- Sangluc K.; Kyoong C. H.; Sun S. J.; Hwan Y. J.; Suk J. M.; Rak K. H.; Young S. J.; Hyun K. J.; Joon C. H.; Suh H. S. 2001. Cryopreservation of *Taxus chinensis* suspension cell cultures. *CryoLetters* 22(1): 43-50.
- Sangwan-Norreel B.; Dubois F.; Flandre F.; Lavieville L.; Paul H.; Sangran R. 1991. *In vitro* culture and plant improvement. *Acta Horticulturae.* 289: 1-32.
- Sano F.; Asakawa A.; Inoue Y.; Sakurai M. 1999. A Dual Role for Intracellular Trehalose in the Resistance of Yeast Cells to Water Stress. *Cryobiology* 39: 80–87.
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M. 2003. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6849–6854.
- Schluepmann H.; Van Dijken A.; Aghdasi M.; Wobbes B.; Paul M.; Smeekens S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant. Physiol.* 135:879–890.
- Schiraldi C, Lernia ID, Rosa MD. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 20:420-425.
- Skirvin R. M.; Norton M.; Mcpheeters K. D. 1993. Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement?. *Acta Hortic.* 336(3):33–340.
- Smith L. T.; Smith G. M.; D'Souza M. R.; Pocard J. A.; Rdulier D. L.; Madkour M. A. 1994. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *J. Exp. Zool.* 268:162--165.

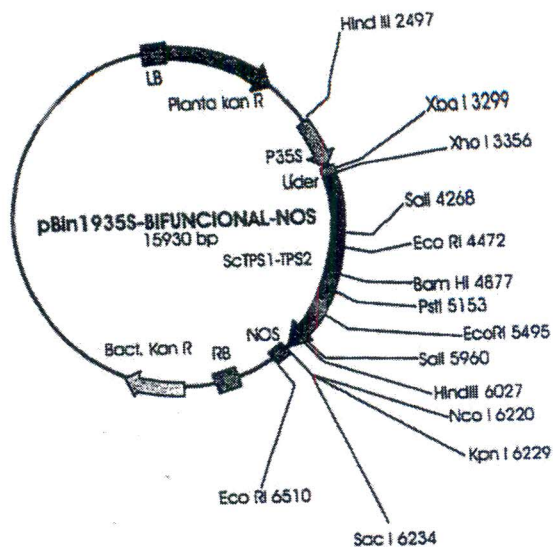
- Stiller, I.; Dulai, S.; Kondrák, M.; Tarnai, R.; Szabó, L.; Toldi, O.; Bánfalvi, Z. 2008. Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta* 227(2):299-308.
- Suárez, R.; Calderón, C.; Iturriaga, G. 2009. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Science* 49(5): 1791-1799.
- Suk C. J.; Mi H. S.; Yeon J. S.; Seon J. Y.; Dongll K. 2007. Cryopreservation of transgenic rice suspension cells producing recombinant hCTLA4Ig. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(6): 1470-1476.
- Takagi H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm. H. Takagi and F. Engelmann (Eds.). IPGR. Rome, Italy. Pp. 178-193.
- Teixeira da Silva J. A. 2003 Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21: 715-766.
- Towill L. E. 1985. Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. In: Cryopreservation of plant cells and organs. K. K. Kartha (Ed). CRC Press. Boca Raton , Florida. Pp. 171-198.
- Turner S.; Krauss S. L.; Bunn E.; Senaratna T.; Dixon K.; Tan B.; Touchell. 2001. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Sci.* 161:1099–1106.
- Valle-Sandoval, M.R. 2008. Obtención de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Kitam) cv Indianápolis que acumulan trehalosa. Tesis de Doctorado en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo Departamento de Fitotecnia, Chapingo, Estado de México. México. 137 pp.
- Weising K.; Nybom H.; Wolff K.; Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants. Principles , methods and applications. Second edition. CRC Press. 444 pp.
- White P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. J. Casteell press, Loncaster, USA.
- Williams J. G. K.; Kubelik A. R.; Livak K. J.; Rafalski J. A.; Scott V. T. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.

- Wingler A.; Fritzius T.; Wiemken A.; Boller T.; Aeschbacher R. A. 2000. Trehalose Induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene, *ApL3*, and Starch Synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 124:105–114.
- Withers L. A. 1978. Freeze preservation of synchronously dividing cultured cells of *Acer pseudoplatanus* L. *Cryobiology* 15:87-92.
- Wolff K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in Chrysanthemum. *Euphytica* 89:159–164.
- Zentella, R.; Mascorro-Gallardo, J.O.; van Dijck, P.; Mallol, J.; Bonini, B.; van Vaeck, C.; Gaxiola, R.; Covarrubias, A.A.; Sotelo, J.; Thevelein, J.M. & Iturriaga G. 1999. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defect in a yeast *tsp1* mutant. *Plant Physiology*, 119, 1473-1482.
- Yamazaki, H.; Ayabe, K.; Ishii, R.; Kuriyama, A. 2008. Desiccation and cryopreservation of actively-growing cultured plant cells and protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97(2): 151-158.

Características del material trágénico.

Medios de cultivo y condiciones experimentales. Para la transformación fue empleado el medio MS sin hormonas y con 20 g L⁻¹ de glucosa. El medio selectivo para regeneración fue el medio MS con 2 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIA, 20 g L⁻¹ de glucosa, 250 mg L⁻¹ de ticarcilina y 10 mg L⁻¹ de Kanamicina durante 1 semana. Posterior a la semana, los explantes se pasaron a medio MS con 2 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIA, 20 g L⁻¹ de glucosa, 125 mg L⁻¹ de ticarcilina y 10 mg L⁻¹ de kanamicina en el cual se mantuvieron hasta la formación de callo y yemas, que en promedio fue de 1 semana. En esa etapa, fueron transferidos a medio MS con 2 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 125 mg L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg L⁻¹ de kanamicina, hasta la formación de brotes, lo cual requirió un promedio de 3 semanas. Una vez que los brotes tenían un tamaño de 1 cm fueron transferidos a medio MS sin hormonas, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 125 mg L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg L⁻¹ de kanamicina, para que los brotes alcanzaran un tamaño adecuado, entre 5 a 8 cm. Finalmente estos brotes se llevaron a la etapa de enraizamiento en un medio que contenía la mitad de sales del medio MS, 15 g L⁻¹ de sacarosa, 125 mg L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg L⁻¹ de kanamicina, las raíces se desarrollaron por espacio de 2 semanas. Todos los cultivos fueron desarrollados en una temperatura de 24 ± 1 °C (16 horas de fotoperíodo, 96 μmol.m⁻².s⁻¹, con lámparas fluorescentes).

Cepa de *Agrobacterium* y plásmido. El vector empleado fue el pBIN35S-BIF con los genes *TPS1* y *TPS2* de *Sacharomyces cereviseae* que se fusionaron traduccionalmente (Miranda *et al.*, 2007), empleando como promotor el CaMV 35S en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

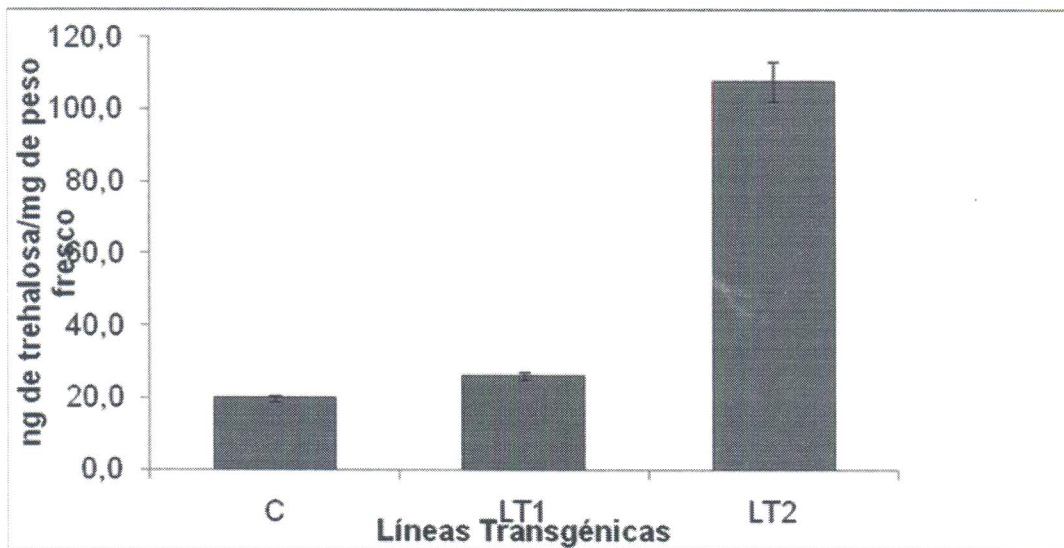


Transformación y selección de transformantes. Cortes de tallos que fueron empleados como explantes se colocaron en el medio para cocultivo, en el cual a cada explante se inoculó con un volumen entre 15 a 20 μL de la suspensión bacteriana, la cual contenía el cultivo bacteriano en una solución de glucosa 10 mM y acetosiringona 100 μM ajustado a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Después de 3 días de cocultivo los explantes se transfirieron al medio selectivo y condiciones descritas anteriormente.

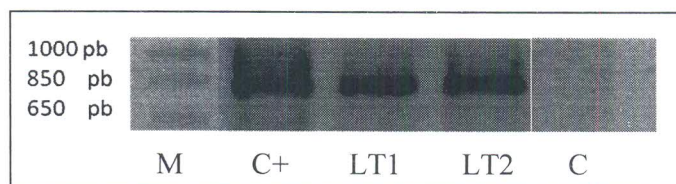
Detección de trehalosa por HPLC. Para la cuantificación de trehalosa por CLAE se utilizó una columna para análisis de carbohidratos Agilent Zorbax®, con un flujo de 1 ml.minuto⁻¹ a una temperatura de 30° C., utilizando como fase móvil una mezcla previamente filtrada y sonificada con acetonitrilo: Agua (grado HPLC) en proporciones de 65:35. El cromatógrafo empleado fue un modelo KS801 de la marca de Waters®, (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), equipado con un sistema de distribución de disolventes (bomba 600E) y un detector de UV con rearreglo de diodos Waters 410®, integrado a un equipo de computo. El procesamiento y manejo de los datos cromatográficos se hizo a través del programa Millenium 2000 (Waters). Para la cuantificación de trehalosa de las muestras se compararon con los siguientes estándares: 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$. La extracción y cuantificación de trehalosa, se

realizó a partir de las líneas transgénicas de cada construcción más su respectivo testigo (planta sin transformar).

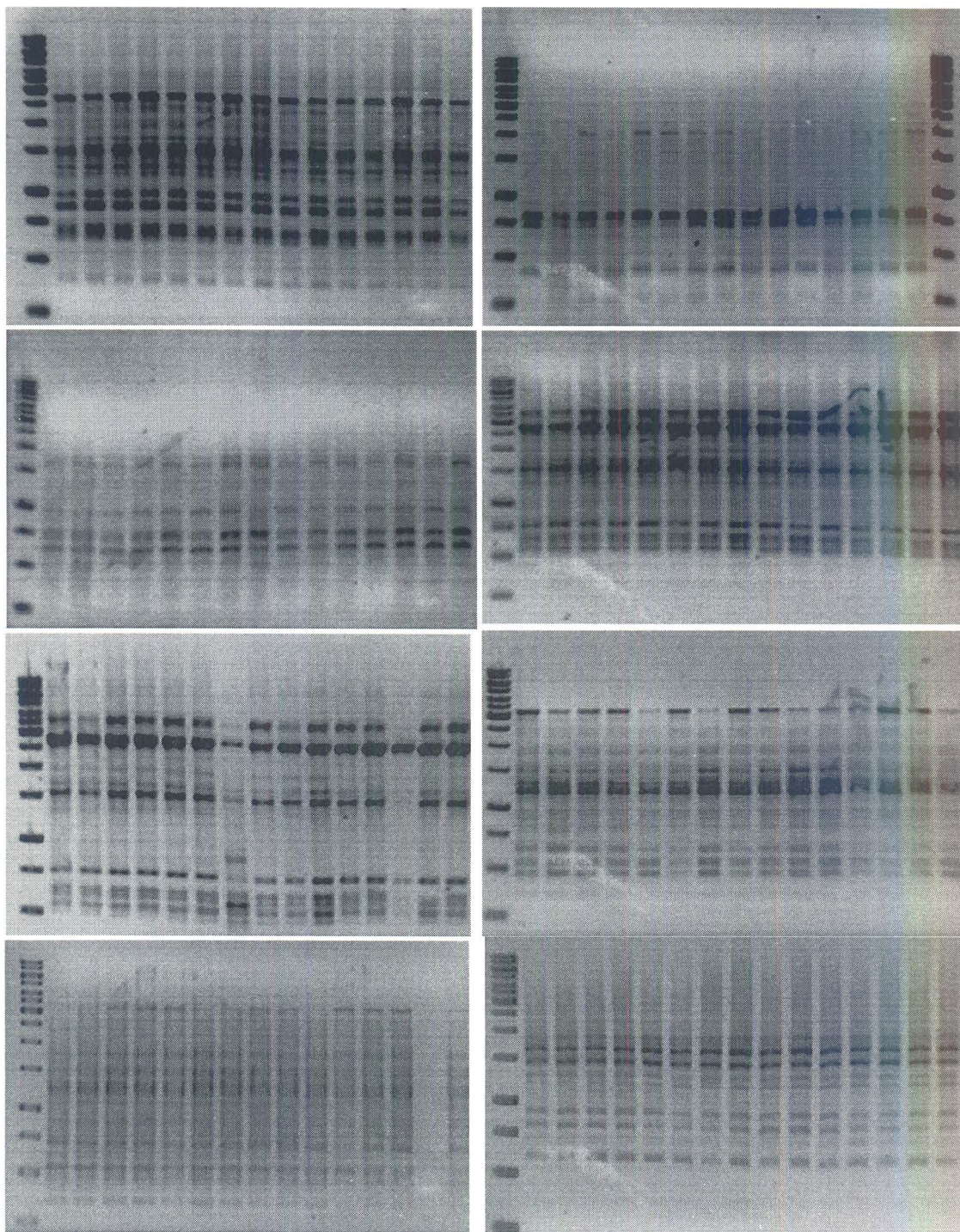
Contenido de trehalosa y detección del gen en crisantemo 'Indianápolis'



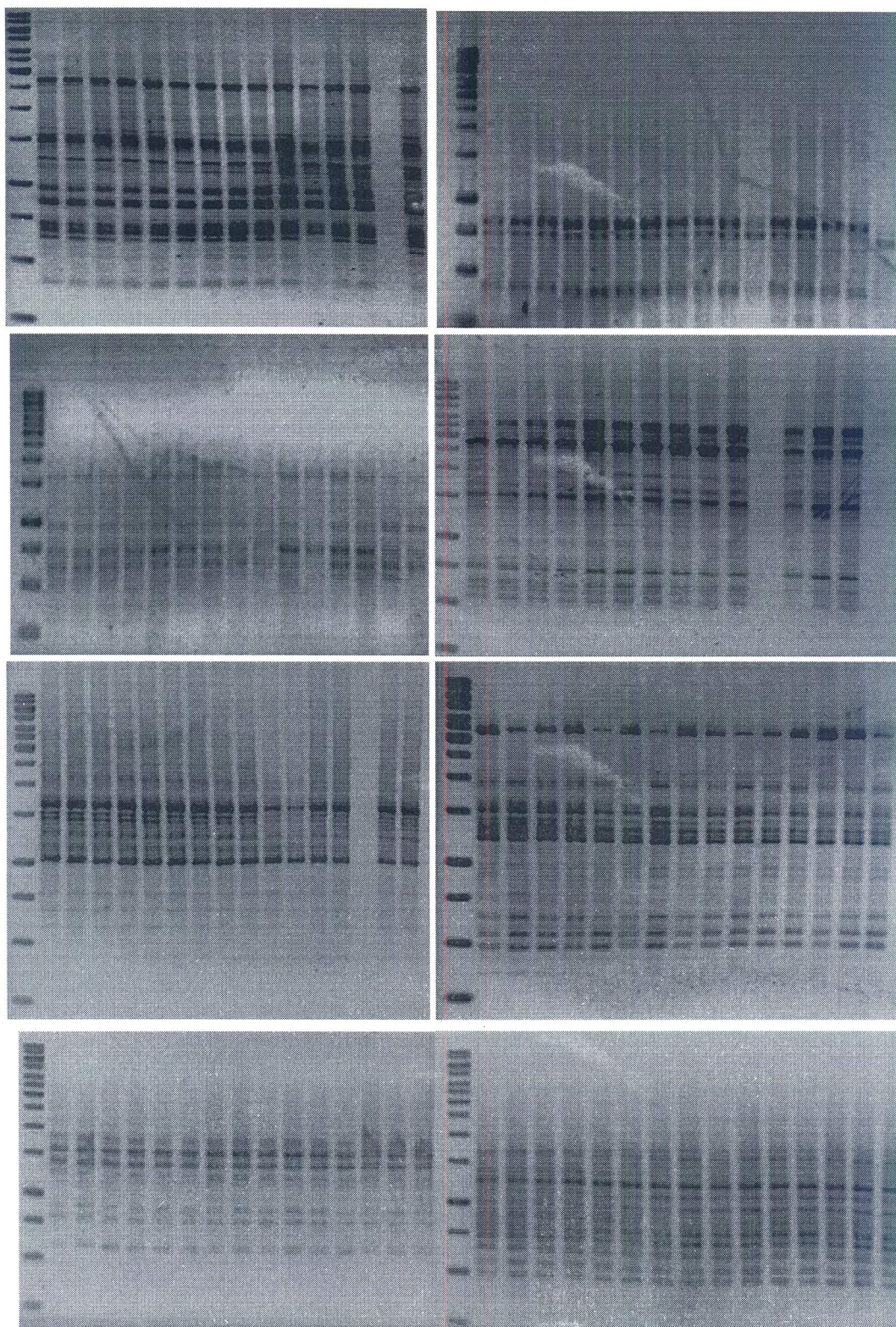
Contenido de trehalosa de la no transgénica (C) y las líneas transgénicas (LT1 (8) y LT2 (19)) analizadas mediante HPLC.



Amplificación por PCR de un fragmento de 780 pb del gen *NPTII*, empleado como gen de selección al hacer la transformación genética. En el control positivo (C+) se amplificó el fragmento de *Arabidopsis* transformada con el vector pBI121 que también lleva el gen *NPTII*.



Geles de agarosa al 1.5 % de plantas sin crioconservar del control (carriles 1-5), de la LT2 (6-10) y de la LT1 (11-15) con iniciador ROTH-1 (a), ROTH-2 (b), ROTH-3 (c), ROTH-4 (d), ROTH-5 (e), ROTH-7 (f) y ROTH-8 (g).



Geles de agarosa al 1.5 % de plantas crioconservadas del control (carriles 1-5), de la LT2 (6-10) y de la LT1 (11-15) con iniciador ROTH-1 (a), ROTH-2 (b), ROTH-3 (c), ROTH-4 (d), ROTH-5 (e), ROTH-7 (f) y ROTH-8 (g).