

## CRIOCONSERVACION DE APICES DE *CITRUS SINENSIS*<sup>(1)</sup>

Natalia R. DOLCE<sup>(2)</sup>; Adriana M. SCOCCHI<sup>(3)</sup> y Luis A. MROGINSKI<sup>(4)</sup>

**ABSTRACT:** Sweet orange shoot tips (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. "Valencia late") obtained from plantlets derived from nucella-*in vitro* cultures were cryopreserved by the encapsulation-dehydration technique. The optimal survival rate (65%) was obtained when encapsulated shoot tips were pre-grown for 3 days in a medium containing 0.5M sucrose, desiccated for 5 h in silica gel and frozen slowly (1°C/min) from 20°C to -30°C before immersion in liquid nitrogen (-196°C). Recovered plantlets from cryopreserved shoot tips were successfully transferred to pots.

**RESUMEN:** Apices de naranjo dulce *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. "Valencia late" extraídos de plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de nucelas fueron exitosamente crioconservados aplicando la técnica encapsulación-deshidratación. Los mejores porcentajes de sobrevivencia (65%) se obtuvieron cuando los ápices encapsulados fueron pretratados con sacarosa 0.5M durante 3 días y luego se deshidrataron en silica gel (5 h). Posteriormente, los ápices fueron sometidos a un descenso programado de temperatura desde 20°C hasta -30°C (1°C/min), seguido de inmersión directa durante 1 hora en nitrógeno líquido (-196°C). Las plantas derivadas de los ápices crioconservados fueron exitosamente transferidas a macetas.

**Palabras claves:** *Citrus sinensis*, cultivo *in vitro*, ápices, crioconservación, encapsulación-deshidratación.

**Key words:** *Citrus sinensis*, *in vitro* culture, shoot tips, cryopreservation, encapsulation-dehydration.

### INTRODUCCIÓN

Los recursos genéticos vegetales constituyen una de las riquezas naturales fundamentales de las cuales depende la seguridad alimentaria mundial. La erosión genética es un problema a escala mundial y la iniciativa de medidas para evitarla comenzó a tomar auge con la segunda guerra mundial. A partir de ese momento se producen profundas modificaciones en el sector agrícola con la introducción de variedades altamente productivas y homogéneas que sustituyeron a las variedades tradicionales. Los beneficios asociados a este cambio posibilitaron un elevado incremento en la productividad de los cultivos. No obstante, ello también implicó la pérdida irreparable de muchas variedades, caracterizadas por su elevada heterogeneidad y baja productividad, pero también por su resistencia a condiciones adversas (sequías, enfermedades, plagas), Mroginiski *et al.* (1991).

---

(1) Trabajo realizado en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. C.C. 209, Corrientes (3400), Argentina.

(2) Becaria de Pre-Grado SGCyT. UNNE. Botánica III (Fisiología Vegetal), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE.

(3) Profesora Adjunta Botánica III (Fisiología Vegetal), FACENA y JTP Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. E-mail: scocchi@agr.unne.edu.ar

(4) Profesor Titular Fisiología Vegetal Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Investigador Principal CONICET.

Si bien ésto es un hecho conocido, en la medida que los recursos genéticos no se conserven adecuadamente no se podrá disponer de ellos en el mediano y largo plazo. La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de estrategias para conservar, caracterizar y evaluar los recursos genéticos. Hoy en día esta necesidad es aceptada como una responsabilidad social y esencial para la preservación de la biodiversidad, Pita Villamil e Iriondo Alegría (1997).

Cuando se habla de preservación de germoplasma hay que subrayar que el objetivo es conservar, con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos aparecen en la actualidad como una alternativa para la conservación a corto, mediano y largo plazo. Esta última, implica la conservación de los explantes a temperaturas ultrabajas del nitrógeno líquido (-196°C) y se denomina criopreservación, Ashmore (1997). La criopreservación es una valiosa herramienta para conservar a largo plazo (años) nuestros recursos fitogenéticos, ofreciendo la máxima estabilidad de los caracteres genotípicos del germoplasma conservado, así como mínimos requerimientos de espacio y mantenimiento, Engelmann (1997).

Actualmente se dispone de varias técnicas para la criopreservación de germoplasma vegetal, entre las cuales se encuentra la encapsulación-deshidratación. Esta técnica, establecida por Dereuddre *et al.* (1990) usando ápices de plantas *in vitro* de pera, está basada en la técnica de producción de semillas sintéticas, donde embriones somáticos son encapsulados en una cápsula de gel hidrosoluble. El uso de la misma disminuye la vulnerabilidad de los explantes al ser sometidos a tratamientos muy drásticos (como ser pretratamientos con elevadas concentraciones de azúcares seguidos por una intensa deshidratación), Cho *et al.* (2002a).

En el IBONE, desde hace algunos años se viene trabajando en la conservación y criopreservación de germoplasma vegetal, Scocchi *et al.* (2004 a y b); Scocchi y Mroginski (2004). A excepción del trabajo realizado por Dolce *et al.* (2002); en nuestro país no se conocen antecedentes bibliográficos respecto a la criopreservación de cultivares cítricos. En el mundo, se citan antecedentes referidos a la criopreservación de varias especies de *Citrus* mediante la utilización de distintos explantes, como por ejemplo semillas, Mumford y Grout (1979); óvulos, Bajaj (1984); embriones somáticos, González-Arno *et al.* (2003); callos nucelares, Sakai *et al.* (1991); ejes embriogénicos, Cho *et al.* (2002 a y b); suspensiones celulares, Aguilar *et al.* (1993) y callos embriogénicos derivados de óvulos, Pérez *et al.* (1999).

Para la conservación de germoplasma, los tejidos organizados tales como ápices o meristemas son de preferencia sobre suspensiones celulares o callos debido a que los primeros son genéticamente más estables, Bajaj (1991). Sin embargo, la información sobre la criopreservación de ápices o meristemas de especies cítricas es aún muy limitada. Wang *et al.* (2002a) emplearon la técnica encapsulación-deshidratación utilizando como explantes ápices de "Troyer" citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Por otra parte, Cho *et al.* (2002a) trabajaron con ejes embriogénicos de *Citrus madurensis* y González-Arno *et al.* (2003) aplicaron esta técnica utilizando óvulos y embriones somáticos de varias especies de cítricos.

También fue posible la criopreservación de ejes embriogénicos de *Citrus madurensis* empleando la técnica de vitrificación (Cho *et al.*, 2002b) y de ápices de "Troyer"

citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) por encapsulación-vitrificación (Wang *et al.*, 2002b).

No obstante, hasta el momento no se citan antecedentes referidos a la crioconservación de ápices de *Citrus sinensis* cv. "Valencia late" con el uso de alguna de las técnicas de crioconservación.

El objetivo de este trabajo fue optimizar una metodología *in vitro* que posibilite la crioconservación de ápices de naranjo dulce (*Citrus sinensis* cv. "Valencia late"), uno de los cultivares cítricos de gran interés para Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se cultivaron ápices de naranjo dulce *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. "Valencia late" provenientes de la germinación de embriones somáticos obtenidos por cultivo *in vitro* de nucelas a partir de frutos inmaduros de 14-15 semanas post-polinización (aproximadamente de 3.5 a 4 cm de diámetro). Los frutos fueron desinfectados por inmersión en etanol 70% durante 5 min, seguida por inmersión en una solución de NaOCl al 1.6% durante 30 min. Luego, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se disectaron los frutos en una cabina de flujo laminar de aire estéril, se extrajeron las semillas y, siguiendo el procedimiento desarrollado por Rey *et al.* (1995), se aislaron las nucelas, las cuales fueron cultivadas en el medio basal de Murashige y Skoog (1962) -MS- con la adición de ácido indolacético (AIA) 1 mg/L + cinetina (CIN) 0.1 mg/L. El pH de los medios fue ajustado a 5.8 antes del agregado de 0.75% de agar Sigma (A-1296). Se utilizaron frascos de vidrio de 100 cm<sup>3</sup> de capacidad conteniendo 25 mL de medio de cultivo. Los frascos fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en autoclave (0.101 Mpa durante 20 min). Luego del cultivo (4 explantes o medias nucelas por frasco), los frascos fueron mantenidos en un cuarto climatizado a 27 ± 2°C con un fotoperíodo de 14 h (intensidad lumínica de 116 μm m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>).

Al cabo de 30 días se obtuvieron embriones somáticos en forma directa (sin la fase intermedia de callo), los que germinaron en el mismo medio de cultivo y cuyos ápices (de aproximadamente 2-3 mm) fueron utilizados como explante en este trabajo.

### Precultivo

Los ápices, una vez disectados, fueron cultivados en un medio de inducción de vástagos constituido por MS suplementado con sacarosa 50 gr/L + bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg/L + ácido indolbutírico (IBA) 0.25 mg/L + sulfato de adenina 40 mg/L + extracto de malta 750 mg/L, solidificado con agar 0.85%; siguiendo el procedimiento realizado por González-Arno *et al.* (1998) para la crioconservación de ápices de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Los explantes fueron precultivados por 24 h en un cuarto climatizado a 27 ± 2°C con un fotoperíodo de 14 h (intensidad lumínica de 116 μm m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>).

### Protocolo de Crioconservación: Técnica Encapsulación – Deshidratación

Luego del precultivo, trabajando en una cabina de flujo laminar de aire estéril a temperatura ambiente, los explantes fueron encapsulados en un gel de alginato de sodio al 3%, polimerizado con una solución 0.1 M de cloruro de calcio. Cada cápsula contenía un explante.

Posteriormente, los explantes fueron sometidos a 8 tratamientos (ver Tabla 1), con el objeto de evaluar el efecto de la duración del pretratamiento con alta concentración de azúcar (0.5 M sacarosa) sobre la sobrevivencia de los ápices luego de ser llevados a nitrógeno líquido (Tratamientos 2, 3, 5 y 6). Además, para confirmar la no fitotoxicidad del alto potencial osmótico con que los ápices fueron pretratados (Tratamientos 1 y 4), la optimización del medio de cultivo utilizado (Tratamiento 7) y la consistencia de la cápsula (Tratamiento 8).

Los explantes fueron pretratados (ver Tabla 1) en el medio de inducción de vástagos con la adición de sacarosa 0.5M (durante 3 ó 4 días) y mantenidos en agitación permanente en forma líquida. Luego, fueron deshidratados con silica gel en cámaras herméticamente cerradas durante 5 h (alrededor de un 25% del contenido de humedad, basado en el peso fresco), Scocchi *et al.* (2004a). Los ápices encapsulados y deshidratados fueron transferidos a tubos de polipropileno (crioviales) estériles de 5 mL (10 ápices encapsulados/criovial) y llevados a inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C) por 1 h o a un programador de descenso controlado de temperatura (desde 20°C hasta -30°C) descendiendo 1°C/min, y luego inmersos en nitrógeno líquido durante 1 h. Finalmente, los ápices encapsulados fueron descongelados rápidamente a Baño de María durante 1 min a 30°C y recultivados en el mismo medio antes descrito e incubados durante la primer semana en oscuridad a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, los mismos fueron transferidos a un cuarto climatizado a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo de 14 h (intensidad lumínica de  $116 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Todos los tratamientos fueron repetidos tres veces con 10 réplicas por cada uno. Los mismos fueron evaluados a los 21 días de haber realizado el descenso programado de temperatura.

**Tabla 1:** Detalle de los tratamientos realizados

N°	Tratamientos
1	Testigo (pretratamiento 3 d 0.5M de sacarosa) → Recultivo
2	Pretratamiento 3 d 0.5M de sacarosa → Deshidratación 5 h → -30°C → -196°C → Recultivo
3	Pretratamiento 3 d 0.5M de sacarosa → Deshidratación 5 h → -196°C → Recultivo
4	Testigo (pretratamiento 4 d 0.5M de sacarosa) → Recultivo
5	Pretratamiento 4 d 0.5M de sacarosa → Deshidratación 5 h → -30°C → -196°C → Recultivo
6	Pretratamiento 4 d 0.5M de sacarosa → Deshidratación 5 h → -196°C → Recultivo
7	Testigo sin cápsula → Cultivo
8	Testigo con cápsula → Recultivo

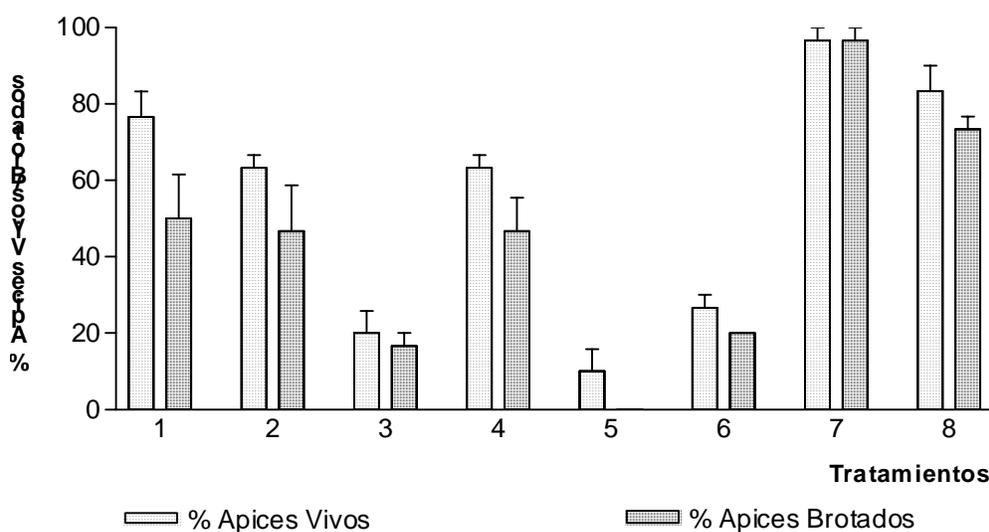
No fue necesario remover las cápsulas para extraer los explantes, ya que los mismos la atravesaron sin ningún inconveniente.

Una vez que los ápices crecieron, transformándose en vástagos bien desarrollados (1.5-2 cm de longitud), alrededor de 7-8 semanas después del recultivo, fueron transferidos a un medio de enraizamiento constituido por MS + ácido naftalenacético (ANA) 1 mg/L + IBA 2 mg/L (Dolce *et al.*, 2003). Esto permitió la obtención de plantas completas, que luego fueron transferidas a macetas y mantenidas en un invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura para su aclimatación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pretratamientos con una alta concentración de azúcar (0.5 M) fueron realizados con el objeto de proteger (crioprotección) a los explantes que seguidamente serían sometidos a una temperatura ultrabaja. Los testigos de estos tratamientos de azúcares (Tratamientos 1 y 4) presentaron alrededor de un 70% de sobrevivencia y 50% de ápices brotados, confirmando con ello la no fitotoxicidad del alto potencial osmótico con que los ápices fueron pretratados.

Los testigos sin y con cápsula brindaron porcentajes de sobrevivencia del 97-85% y 97-75% de ápices brotados respectivamente, estableciendo con ello la optimización del medio de cultivo utilizado (Tratamiento 7) y de la consistencia de la cápsula (Tratamiento 8) (Fig. 1).



**Fig. 1:** Efecto de diferentes pretratamientos en el porcentaje de sobrevivencia de ápices de naranjo dulce.

El mejor tratamiento consistió en pretratar los ápices encapsulados con sacarosa (0.5M) durante 3 días, deshidratarlos en sílica gel (5 h), llevarlos a descenso programado de temperatura desde 20°C hasta -30°C (1°C/min), y luego a inmersión en nitrógeno líquido (1 h) (Tratamiento 2). Con este procedimiento, los explantes sobrevivieron al nitrógeno líquido en un 65%, con un 47% de ápices brotados (Figs. 1 y 2).

En el caso de los tratamientos con inmersión directa en nitrógeno líquido (Tratamientos 3 y 6), éstos arrojaron un 20-27% de sobrevivencia respectivamente, con un porcentaje de ápices brotados de alrededor del 20% para ambos tratamientos.

Cuando los ápices se pretrataron 4 d con sacarosa, se deshidrataron con sílica gel y luego fueron llevados a descenso programado de temperatura (Tratamiento 5) se obtuvieron porcentajes bajos de sobrevivencia (10%), sin lograr la brotación de ninguno de los explantes (Fig. 1).

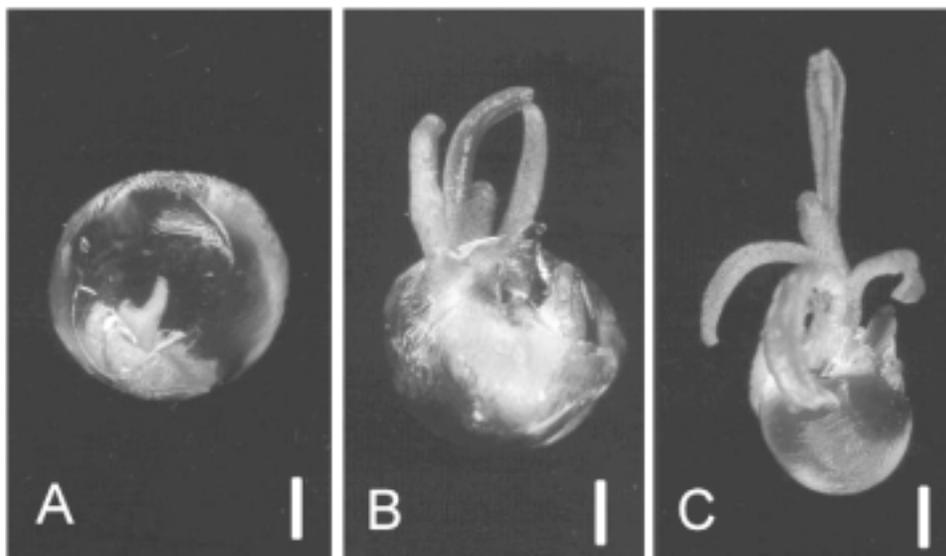
Los ápices brotados en los distintos tratamientos realizados, fueron transferidos a medio de enraizamiento (MS + ANA 1 mg/L + IBA 2 mg/L) con un 80% de establecimiento (rizogénesis directa) y transferencia a sustrato (Fig. 3).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado por González-Arno *et al.* (1998), quienes aplicaron la misma técnica para la criopreservación de ápices de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., arrojando nuestros resultados porcentajes algo superiores.

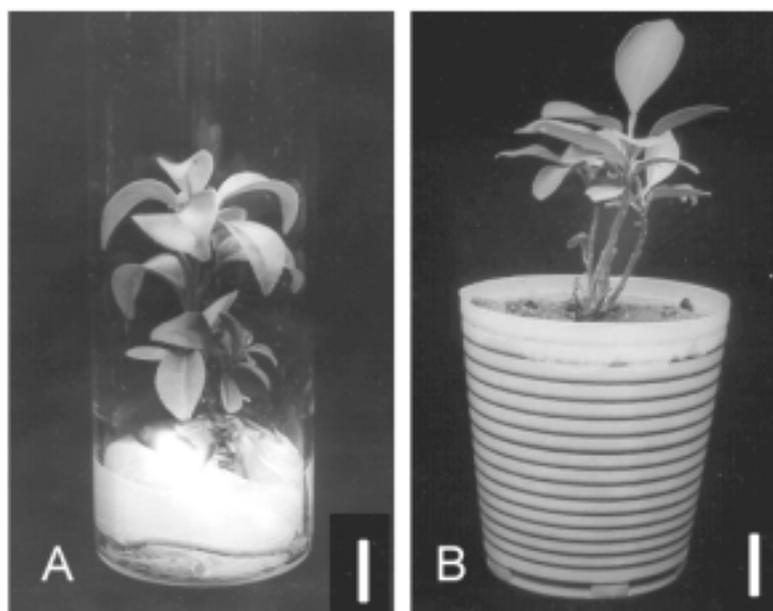
Wang *et al.* (2002a) trabajando con ápices de "Troyer" citrange obtenidos por cultivo de semillas, utilizando la técnica encapsulación-deshidratación y pretratando los explantes con sacarosa (0.3 a 1M) durante 4 d, lograron la sobrevivencia de los mismos en un 76-80%, aunque no proporcionan información respecto a la obtención de plantas completas.

Por otra parte, utilizando la técnica encapsulación-vitrificación para ápices de "Troyer" citrange y pretratándolos con sacarosa (1M) durante 4 d, Wang *et al.* (2002b) obtuvieron un 100% de sobrevivencia de los explantes, sin mencionar datos posteriores de regeneración.

Experiencias realizadas con ejes embriogénicos de *Citrus madurensis* aplicando las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación, arrojaron valores entre 52-65% de sobrevivencia (Cho *et al.*, 2002a y b) y con la técnica de encapsulación-deshidratación aplicada a óvulos de varias especies de cítricos (*Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. limon*) se obtuvo solo un 2-16% de sobrevivencia dependiendo de los pretratamientos realizados (González-Arno *et al.*, 2003).



**Fig. 2:** Detalle de los ápices encapsulados de naranjo dulce **A**-7 d (barra = 0.1 cm), **B**-14 d (barra = 0.1 cm), **C** - 21 d (barra = 0.16 cm) de haber realizado el descenso programado de temperatura.



**Fig. 3:** **A**-Planta de naranjo dulce obtenida a partir de la crioconservación de ápices encapsulados (barra = 0.72 cm), **B**-Transferencia a maceta (barra = 1.7 cm).

## CONCLUSIÓN

Este trabajo constituye la primera evidencia publicada de crioconservación en la cual se utiliza como explante ápices de *Citrus sinensis* cv. "Valencia late". Debido a la mayor estabilidad genética, tejidos organizados como ápices son preferibles para la conservación de germoplasma a largo plazo, respecto al uso de suspensiones celulares o callos. Estos últimos son los explantes más frecuentemente utilizados para la conservación de líneas celulares.

Fue posible la crioconservación de ápices de naranjo dulce *Citrus sinensis* cv. "Valencia late", con un porcentaje variable de sobrevivencia de acuerdo al tratamiento realizado. Los vástagos obtenidos fueron transferidos a medio de enraizamiento para la obtención de plantas completas, las que fueron exitosamente llevadas a macetas en invernadero para su aclimatación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Aldo Goytia por las ilustraciones.

Esta investigación fue posible gracias a la ayuda financiera del CONICET y de la Secretaría General de Ciencia y Técnica (UNNE).

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, M.E.; F. ENGELMANN and N. MICHAUX-FERRIERE, 1993. Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *Cryo-Letters*, 14: 217-228.
- ASHMORE, S.E., 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. In: F. Engelmann (ed.). IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute): 1-67.
- BAJAJ, Y.P.S., 1984. Induction of growth in frozen embryos of coconut and ovules of *Citrus*. *Curr Sci*, 53: 1215-1216.
- BAJAJ, Y.P.S., 1991. Storage and cryopreservation of *in vitro* cultures. Pp. 361-381. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.): *High-tech and micropropagation*. Biotechnology in agriculture and forestry. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 17.
- CHO, E.G.; Y.L. HOR; H.H. KIM; V. RAMANATHA RAO and F. ENGELMANN, 2002a. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters*, 23: 325-332.
- CHO, E.G.; Y.L. HOR; H.H. KIM; V. RAMANATHA RAO and F. ENGELMANN, 2002b. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification solution. *Cryo-Letters*, 23: 317-324.
- DEREUDRE, J.; C. SCOTTEZ; Y. ARNAUD et M. DURON, 1990. Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), enrobés dans l'alginat, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: effet d'un endurcissement préalable au froid. *C R Acad Sci Paris Ser III*, 310: 317-323.
- DOLCE, N.; A. SCOCCHI y L. MROGINSKI, 2002. Aplicación de la técnica Encapsulación-Deshidratación para la crioconservación de ápices de *Citrus sinensis*. Actas de la XIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas (SGCyT). Resistencia, Chaco.

- DOLCE, N.; A. SCOCCHI y L. MROGINSKI, 2003. Regeneración *in vitro* de plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osb. a partir de cotiledones. Actas de la XIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas (SGCyT). Corrientes (Capital).
- ENGELMANN, F., 1997. *In vitro* conservation methods. In: Callow, J.A.; B.V. Ford-Lloyd y H.J. Newbury (eds.): *Biotechnology and plant genetic resources*. CAB International, Oxon: 119-161.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; F. ENGELMANN; C. URRÁ; M. MORENZA and A. RIOS, 1998. Cryopreservation of *Citrus* apices using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters*, 19: 177-182.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; J. JUÁRREZ; C. ORTEGA; L. NAVARRO and N. DURÁN-VILA, 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of *Citrus* using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters*, 24: 85-94.
- MROGINSKI, L.A.; W. ROCA and K.K. KARTHA, 1991. Crioconservación del germoplasma. En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds.): *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Cali, Colombia): 715-730.
- MUMFORD, P.M. and B.W.W. GROUT, 1979. Desiccation and low temperature (-196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. *Seed Sci Technol*, 7: 407-410.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- PÉREZ, R.M.; O. MAS; L. NAVARRO and N. DURÁN-VILA, 1999. Production and cryopreservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 71-74.
- PITA VILLAMIL, J.M. y J.M. IRIONDO ALEGRÍA, 1997. Conservación de recursos fitogenéticos. *Agricultura*: 800-803.
- REY, H.Y.; L.A. MROGINSKI y A.M. SCOCCHI, 1995. Embriogénesis somática en especies cítricas por cultivo de nucelas. *Hort. Arg.*, 14 (36): 54-64.
- SAKAI, A.; S. KOBAYASHI and I. OIYAMA, 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) by simple freezing method. *Plant Science*, 74: 243-248.
- SCOCCHI, A.M.; M. FALOCI; R. MEDINA; S. OLMOS and L.A. MROGINSKI, 2004a. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica*, 135: 29-38.
- SCOCCHI, A.; E. DIERINGER; E. MROGINSKI y L. MROGINSKI, 2004b. Conservación de semillas del cedro australiano (*Toona ciliata*). Plant Genetic Resources Newsletter. IPGRI, 137: 22-25.
- SCOCCHI, A. and L. MROGINSKI, 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. *Phyton*: 137-143.
- WANG, Q.C.; O. BATUMAN; P. LI; M. BAR-JOSEPH and R. GAFNY, 2002a. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of "Troyer" citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, 20: 901-906.
- WANG, Q.C.; O. BATUMAN; P. LI; M. BAR-JOSEPH and R. GAFNY, 2002b. A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of "Troyer" citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, 128 (1): 135-142.

*Recibido/Received: 08-mar-04*  
*Aceptado/Accepted: 16-nov-04*