

香蕉离体茎尖超低温保存研究

李俊慧^{1,2}, 何平¹, 陈晓玲², 卢新雄², 辛霞², 张志斌², 辛萍萍²

(¹西南大学生命科学学院, 重庆 400715; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:以香蕉(*Musa* spp.)试管苗为试材,对其离体茎尖小滴玻璃化法超低温保存的影响因素进行了研究。小滴玻璃化法和玻璃化法超低温保存后再生率的差异表明,香蕉更适合用小滴玻璃化法进行超低温保存。香蕉小滴玻璃化法超低温保存的方案如下:试管苗在60g/L蔗糖的MS培养基上培养1~2个月,剥离带有1~2片叶原基的茎尖,室温下装载30min(可延长至4h),0℃下PVS2处理40~50min。6个基因型的14个品种的再生率平均为46.9%。通过SSR分子标记检测,再生植株的遗传稳定性没有发生改变。该结果为香蕉种质资源的长期保存提供了理论依据和技术支撑。

关键词:香蕉;离体茎尖;小滴玻璃化法;超低温保存;遗传稳定性

Cryopreservation of *in Vitro* Shoot-Tips of Banana (*Musa* spp.)

LI Jun-hui^{1,2}, HE Ping¹, CHEN Xiao-ling², LU Xin-xiong², XIN Xia²,
ZHANG Zhi-e², XIN Ping-ping²

(¹School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, ²Institute of Crop Sciences,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: *In vitro* shoot-tips of banana (*Musa* spp.) were successfully cryopreserved by droplet vitrification method. The factors affecting the post-thaw regeneration of shoot tips were analyzed. The results showed that the droplet vitrification method was more suitable for cryopreservation of banana *in vitro* shoot-tips than vitrification method. The optimal procedures were as follows: Shoot-tips with 1 or 2 leaf primordia excised from rooted *in vitro* plantlets which were cultured on MS medium supplemented with 60g/L sucrose for 1~2 months. 30min loading time could be prolonged up to 4h at room temperature, and the optimal treatment time of PVS2 was 40~50min at 0℃. The average post-thaw regeneration rate was 46.9% of 14 accessions belonging to six different genomic groups of *Musa* spp. after cryopreservation by droplet vitrification method. There was no variation in the regenerated plantlets on SSR molecular level.

Key words: Banana; *In vitro* shoot-tip; Droplet vitrification method; Cryopreservation; Genetic stability

香蕉(*Musa* spp.)是世界第二大水果,也是发展中国家水稻、小麦、玉米之后的第四大食物来源^[1]。由于香蕉主要栽培品种多为三倍体,为营养性结实,所以不能采用种子保存。而田间保存需要占用大片土地和消耗大量的人力物力,且易受到病虫害的侵袭。试管苗保存需要经常继代,易污染和发生体细胞变异。玻璃化法超低温保存具有设备简单、易操

作和重复性好等优点。在玻璃化法基础上发展起来的小滴玻璃化法,冷冻和解冻速率更快^[2],存活率更高。目前利用小滴玻璃化法已成功保存了马铃薯、芦笋、甘薯、薯蓣、苹果、芋头、大蒜、番木瓜等多种作物茎尖^[3-11]。

目前,香蕉超低温保存材料涉及种子^[12]、合子胚^[13]、胚性悬浮细胞系^[14]、高密度分生组织

收稿日期:2008-11-21

修回日期:2009-09-23

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BA013B10);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(082060302-07);农业部农作物种质资源保护利用专项资助项目(NB08-2130135)

作者简介:李俊慧,硕士。E-mail:lijunhui1231@163.com

通讯作者:何平, E-mail:heping@swu.edu.cn;陈晓玲, E-mail:xlchen@caas.net.cn

团^[15]、试管苗顶端分生组织。种子和合子胚仅适用于野生二倍体香蕉,胚性悬浮细胞系的诱导效率很低,而且并不适用于所有基因型,高密度分生组织团通常诱导出来的质量不高,冻后再生率往往较低。1999年,Thin等^[16]用玻璃化法保存香蕉离体茎尖,再生率平均为69%,其他实验室用此方法保存,得到的再生率普遍较低。2005年,Panis等^[17]用小滴玻璃化法保存了来源于INIBAP的分属8个基因组的56个品种。2006年,吴黎明等^[18]用玻璃化法保存了3个品种的香蕉茎尖,再生率平均为53%。国内未见香蕉小滴玻璃化法超低温保存的研究报道。本文研究了香蕉多个品种的超低温保存,对香蕉离体茎尖小滴玻璃化法超低温保存的影响因素进行了分析,以期尽早建立香蕉离体茎尖超低温保存体系,为长期安全保存香蕉种质资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料是由国家果树种质广州香蕉圃提供的分属6个基因型的14份种质资源,分别为ABB(东大、广粉1号、小米)、AAA(大丰1号、大丰2号、抗枯1号、抗枯5号、巴西、碧盛)、AAAB(SH3640、金手指)、AA(海贡)、ABBB(粉杂1号)、AAB(中山龙牙)。先将试管苗接种在MS+3mg/L BA+0.1mg/L NAA+30g/L 蔗糖+7.0g/L 琼脂的培养基上进行扩繁,培养温度为(25±2)℃,光照14h/d。然后将扩繁的试管苗转移到无激素的MS培养基中生根,1个月以后,将生根苗转移到含60g/L 蔗糖的MS培养基中培养。

1.2 超低温保存方法及程序

1.2.1 茎尖剥离 分别选取在含60g/L 蔗糖的MS培养基上培养不同时间(半个月、1个月、2个月、3个月)的健康植株,在无菌条件下,利用显微镜剥取球茎直径大小为1.5~2mm的茎尖,保留不同数目的叶原基(0、1、2、3片)。茎尖剥离后立即置于MS培养基上,以防干燥。

1.2.2 装载 将剥离后的茎尖室温下装载不同时间(30min、1h、2h、4h),或者在含0.3mol/L、0.4mol/L 蔗糖的MS培养基上预培养2d后再装载。装载液为MS+2mol/L 甘油+0.4mol/L 蔗糖。

1.2.3 脱水处理 将装载后的茎尖转移到无

菌滤纸上,吸干表面液体,再转入玻璃化液PVS2中,在0℃条件下分别处理不同时间(0、20、30、40、50、60min)。PVS2的组成为MS+30%甘油+15%乙二醇+15%二甲基亚砜(DMSO)+0.4mol/L蔗糖。

1.2.4 液氮保存 小滴玻璃化法是将脱水处理后的茎尖转移至铝箔条上的PVS2小滴上(约15μl),将粘有茎尖的铝箔条在液氮里蘸一下,然后直接装入盛满液氮的冷冻管中,投入液氮保存。玻璃化法则是将脱水处理后的茎尖转移到装有1ml新鲜PVS2的冷冻管中,再投入液氮保存。

1.2.5 解冻、洗涤 从液氮中取出装有材料的冷冻管。如果材料是经过小滴玻璃化法保存的,取出冷冻管中的铝箔条,室温下迅速投入MS+1.2mol/L蔗糖卸载液中解冻,几秒钟后,茎尖释放,再将茎尖转入新的卸载液中洗涤15min。如果材料是经过玻璃化法保存的,则将装有茎尖的冷冻管在40℃水浴中快速解冻80s,再转入卸载液中洗涤15min。

1.2.6 恢复培养 将洗涤后的茎尖先在MS+0.3mol/L蔗糖的半固体培养基上暗培养2d(培养基上放一层无菌滤纸),然后在MS+0.5mg/L BA的恢复培养基上暗培养1周,之后转入光下培养,1个月后,观察并统计结果。

1.3 单因子试验

以碧盛香蕉为试材,对茎尖叶原基数目、预培养、装载时间、PVS2处理时间、PVS种类等几个因素进行单因子试验。试验时只变化单因子,其他处理相同,即选取60g/L 蔗糖的MS培养基上培养1个月以上的健康苗,剥离带有1片叶原基的茎尖,室温下装载30min,0℃下PVS2处理40min。每个处理选8~12个茎尖,3次重复。

1.4 遗传稳定性检测

参照Creste等^[19]方法对超低温保存后的再生植株用SSR法进行遗传稳定性检测。香蕉叶片DNA提取用CTAB法。正常生长的试管苗为对照。

1.5 数据统计分析

使用SPSS 11.5和Excel软件对实验数据进行统计分析。每个处理的实验结果以平均值和标准误差来表示,均值之间差异显著性采用邓肯氏新复极差检验($P < 0.05$)方法进行评估。

2 结果与分析

2.1 茎尖叶原基数目对再生率的影响

茎尖叶原基数目对再生率的影响结果见图1。叶原基数目为1片或2片时的再生率显著高于没有叶原基和3片叶原基,最高为50%。1片和2片之间差异不显著。叶原基数目反映了茎尖生长点被叶原基包裹的状态,没有叶原基,生长点完全裸露,1片叶原基半包裹生长点,2片叶原基较1片包裹面积大,但仍没有完全包裹,而3片叶原基则完全包裹生长点。所以,生长点半包裹比完全裸露和完全包裹可以获得更高的再生率。

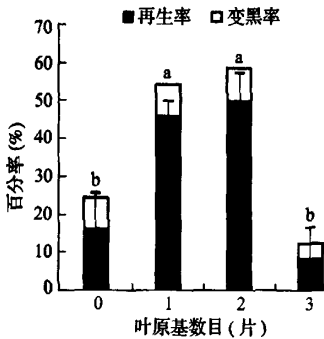


图1 叶原基数目对再生率的影响

Fig. 1 Effect of the leaf primordium number on the regeneration rate

2.2 预培养对再生率的影响

预培养可以减少细胞内自由水含量,增加组织中可溶性糖等保护性物质的含量,使细胞能经受低温胁迫^[20]。本研究以蔗糖作为渗透性保护物质,结果如图2所示,0.3mol/L蔗糖预培养与不预培养之间没有显著差异,而蔗糖浓度升至0.4mol/L时,再生率显著下降。由图2可见,预培养时的变黑率都很高,这是由于茎尖预培养时,受损组织释放的多酚物质发生氧化,从而褐化变黑,而非超低温保存后存在的酶反应。褐化后在表面形成一种不可渗透的物质,从而影响冰冻保护剂的渗透和组织的脱水,导致再生率的降低。所以,对于香蕉茎尖不宜进行预培养处理,这样既能保证再生率,同时也简化了方法。

2.3 装载时间对再生率的影响

装载处理是一个渗透保护的处理过程,可以初步降低组织的含水量,避免由于渗透压变化太强而对材料造成伤害^[21]。本试验用装载液处理时,发现茎尖在室温下装载至4h仍没有明显影响冻后再生率(图3)。因此,香蕉茎尖装载时间不同不会影响再生率。

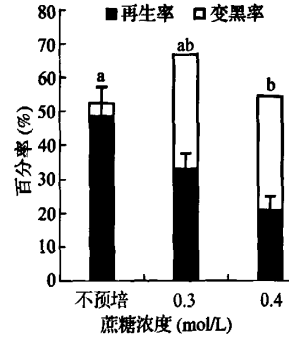


图2 预培养对再生率的影响

Fig. 2 Effect of preculture on the regeneration rate

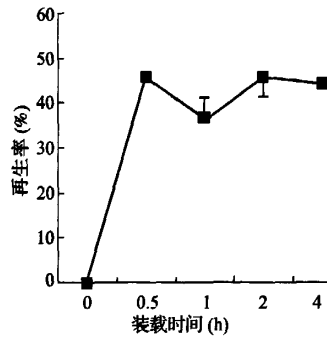


图3 装载时间对再生率的影响

Fig. 3 Effect of loading time on the regeneration rate

2.4 PVS2 处理时间对再生率的影响

将装载后的茎尖在0℃条件下用玻璃化液PVS2处理0~60min,结果见图4。PVS2处理0min再生率为0。随着PVS2处理时间的延长再生率先升高后降低,50min时最高,达62.5%。处理60min时,再生率下降至36.3%。处理30min、40min与50min之间差异不显著,而与20min和60min差异显著。所以,PVS2处理以30~50min为最佳。

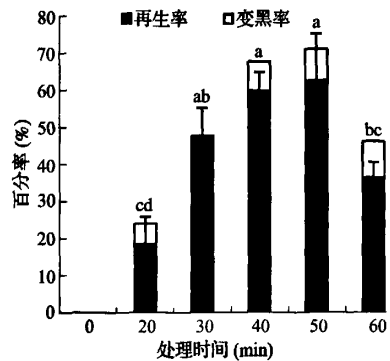


图4 PVS2 处理时间对碧盛再生率的影响

Fig. 4 Effect of different time exposed to PVS2 on the regeneration rate

2.5 不同 PVS 液对再生率的影响

不同玻璃化液处理的茎尖超低温保存后再生率结果见表 1。PVS2 效果最好,其次是 PVS4,但是 PVS4 处理的结果稳定性不好。所以,PVS2 最适于香蕉超低温保存。

表 1 不同玻璃化液对再生率的影响

Table 1 Effect of different PVS on the regeneration rate

处理	再生率(%)
Treatment	Regeneration rate
PVS1	7.9 ± 4.0b
PVS2	52.8 ± 12.5a
PVS3①	11.1 ± 5.6b
PVS3②	9.5 ± 4.8b
PVS4	33.3 ± 17.2ab
Towill	15.7 ± 7.9b

PVS1:MS + 22% 甘油 + 13% 乙二醇 + 15% 二甲基亚砜 + 13% 聚乙二醇
 PVS2:MS + 30% 甘油 + 15% 乙二醇 + 15% 二甲基亚砜 + 0.4mol/L 蔗糖
 PVS3①:MS + 40% 甘油 + 10% 乙二醇 + 10% 二甲基亚砜 + 45% 蔗糖
 PVS3②:MS + 50% 甘油 + 50% 蔗糖
 PVS4:MS + 35% 甘油 + 20% 乙二醇 + 0.6mol/L 蔗糖
 Towill:MS + 35% 乙二醇 + 1mol/L 二甲基亚砜 + 10% 聚乙二醇 + 0.4mol/L 蔗糖

2.6 小滴玻璃化法与玻璃化法的比较

以 5 个品种为试材,比较小滴玻璃化法与玻璃化法保存的效果,结果见图 5。5 个品种用小滴玻璃化法保存后再生率都高于玻璃化法,平均高 25.7%。方差分析表明,碧盛和东大两个品种用两种方法保存的结果达到显著差异($P < 0.05$)。所以,小滴玻璃化法更适用于香蕉超低温保存。

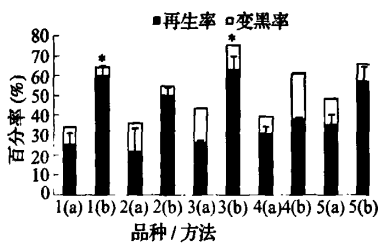


图 5 不同保存方法对再生率的影响

Fig. 5 Effect of cryopreservation methods on the regeneration rate

1:碧盛;2:巴西;3:东大;4:海贡;5:抗枯 1 号

a:玻璃化法;b:小滴玻璃化法

* 表示同一个香蕉品种小滴玻璃化法与玻璃化法相比,保存后的再生率在 0.05 水平达到显著差异($P < 0.05$)

* indicates the regeneration rate of one cultivar cryopreserved by droplet vitrification was significantly different at 0.05 level with that by vitrification method

2.7 不同品种再生率差异

根据单因子试验优化的香蕉小滴玻璃化法超低温保存条件和方法,即选取继代培养 1~2 个月的健壮植株,剥取带有 1~2 片叶原基的茎尖,室温下装载 30min,0℃ PVS2 处理 50min,对分属于 6 个基因型的 14 个香蕉品种的茎尖进行了超低温保存研究,结果见表 2。不同基因型之间经邓肯氏新复极差检验差异不显著($P < 0.05$)。

表 2 香蕉不同品种小滴玻璃化法超低温保存后的再生率
 Table 2 Regeneration rate of different banana cultivars after cryopreservation using droplet vitrification method

品种	基因型	再生率(%)
Variety	Genotype	Regeneration rate
东大	ABB	62.5 ± 7.2
广粉 1 号	ABB	50 ± 7.2
小米	ABB	36.1 ± 1.4
大丰 1 号	AAA	51.8 ± 11.7
大丰 2 号	AAA	45.8 ± 5.8
抗枯 1 号	AAA	57.1 ± 7.1
抗枯 5 号	AAA	24.8 ± 6.3
巴西	AAA	52.8 ± 12.5
碧盛	AAA	62.5 ± 12.5
SH3640	AAAB	43.5 ± 3.6
金手指	AAAB	31.9 ± 3.7
海贡	AA	38.3 ± 0.8
粉杂 1 号	ABBB	51.9 ± 1.9
中山龙牙	AAB	48.2 ± 5.7

2.8 超低温保存后材料的表现类型

按照优化出的超低温方法保存后恢复培养 1 个月,可观察到 4 种不同类型的茎尖,A:茎尖呈白色,表明在投入液氮时立即死亡;B:茎尖完全或部分变黑,说明超低温保存后存在多酚化合物的氧化;C:形成愈伤组织,原因是顶端分生组织以外区域的生长;D:茎尖再生(图 6 中的 A~D)。对于以长期保存为目的的种质资源保存来讲,再生率是最有效的参数。

2.9 超低温保存后植株再生及遗传稳定性

香蕉茎尖超低温保存后多数可以直接再生植株,不经过愈伤组织(图 6-E、F)。再生植株通过诱导可以增殖和生根(图 6-G、H)。这种通过器官发生途径再生成植株可减少变异发生的频率。从再生植株的形态特征上看,没有变异。21 对 SSR 引物扩增电泳图谱分析,未发现超低温保存前后材料的遗传差异,其电泳图谱如图 7。

再生率,培养 1~2 个月的小植株健康、粗壮、生根好、球茎大,保存后再生率高。

高浓度蔗糖预培养没有显著提高香蕉冻后再生率,这点与其他植物不一样。我们的研究目标是建立既可获得高再生率,方法又要相对简单的超低温保存方案,所以,香蕉茎尖不进行预培养,直接装载,本试验中装载 4h 也没有降低再生率。剥取茎尖是一项很费时的的工作,从得到第一个茎尖到最后一个茎尖的时间间隔很长,因此可将剥好的茎尖直接放入装载液,直到所有的茎尖准备好后同时进行下一步的脱水工作。目前,装载的保护机理还不完全清楚,可能是因为装载液存在于质壁分离细胞的原生质周围,不仅减轻了 PVS2 严重脱水引起的渗透压变化^[22],而且通过改变细胞结构和稳定膜结构而增加脱水耐性^[23-24]。

本研究用小滴玻璃化法成功保存了包含二倍体、三倍体和四倍体的 6 个不同基因型的 14 个品种,有望成为香蕉超低温长期保存的常规方法。鉴于香蕉之前被认为是较难进行超低温保存的热带植物,相信小滴玻璃化法也可以为其他热带植物和顽拗型种子植物的超低温长期保存提供借鉴。

参考文献

- [1] 张守梅,李建国,陈厚彬,等. 香蕉种质超低温保存技术研究进展[J]. 果树学报,2005,22(5):537-541
- [2] Towill L E, Bonnart R. Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips [J]. Cryoletters, 2003, 24: 341-346
- [3] Schafer-Menuhr A, Schumacher H M, Mix-Wagner G. Cryopreservation of potato cultivars; design of a method for routine application in genebanks [J]. Acta Hort, 1997, 447: 477-482
- [4] Mix-Wagner G, Conner A J, Cross R J. Survival and recovery of *Asparagus* shoot tips after cryopreservation using the "droplet" method [J]. Crop Hort, 2000, 28: 283-287
- [5] Pennycooke J C, Towill L E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 733-737
- [6] Leunufna S, Keller E R J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1159-1166
- [7] 赵艳华,周锡明,吴永杰. 苹果离体茎尖超低温保存方法的比较[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 719-721
- [8] Sant R, Panis B, Taylor M, et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 92: 107-111
- [9] Kim H H, Lee J K, Hwang H S, et al. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique [J]. Cryoletters, 2007, 6: 471-482
- [10] Ashmore S, Saunders R, Drew R. *In vitro* conservation and cryopreservation of papaya [C] // Engelmann F, Takagi H. Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application, IPGRI, Rome, Italy, 2000: 453-456
- [11] Ashmore S E, Azimi M, Drew R A. Cryopreservation trials in *Carica papaya* [J]. Acta Hort, 2001, 560: 117-120
- [12] Chin H F. Germination and storage of banana seeds [C] // Frison E A, Horry J P, De Waele D. Proceedings of a workshop on new frontiers in resistance breeding for nematode, fusarium and sigatoka, Kuala Lumpur, Malaysia, 1996: 218-227
- [13] Abdelnour-Esquivel A, Mora A, Villalobos V. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB) [J]. Cryoletters, 1992, 13: 159-164
- [14] Panis B J, Withers L A, De Langhe E A L. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants [J]. Cryoletters, 1990, 11: 337-350
- [15] Panis B, Totte N, Van Nimmen K, et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose [J]. Plant Sci, 1996, 121: 95-106
- [16] Tinh N T, Takagi H, Yashima S. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method [J]. Cryoletters, 1999, 20: 163-174
- [17] Panis B, Piette B, Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae* [J]. Plant Sci, 2005, 168: 45-55
- [18] 吴黎明,曾继吾,彭抒昂,等. 香蕉茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 501-506
- [19] Creste S, Tulmann Neto A, Silva S O, et al. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers [J]. Euphytica, 2003, 132: 259-268
- [20] Takagi H, Tien Thinh N, Islam O M, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by vitrification [J]. Plant Cell Rep, 1997, 16: 594-599
- [21] 王子成,邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306
- [22] Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, et al. Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification [J]. Cryoletters, 1999, 20: 89-94
- [23] Matsumoto T, Sakai A, Nako Y. A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia Japonica*) cooled to -196°C by vitrification [J]. Cryoletters, 1998, 19: 27-36
- [24] 曾继吾,牛玉翠,黄永红,等. 利用超低温保存方法脱除香蕉来顶病毒的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(3): 457-460

作者: 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 卢新雄, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍
作者单位: 李俊慧(西南大学生命科学学院, 重庆, 400715; 中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081), 何平(西南大学生命科学学院, 重庆, 400715), 陈晓玲, 卢新雄, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍(中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081)
刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2010, 11(1)

参考文献(24条)

1. Matsumoto T; Sakai A; Nako Y [A novel preculturing for enhancing the survival of in vitro-grown meristems of wasabi \(Wasabia Japonica\) cooled to-196°C by vitrification](#) 1998
2. Charoensub R; Phansiri S; Sakai A [Cryopreservation of cassava in vitro-grown shoot tips cooled to-196°C by vitrification](#) 1999
3. 曾继吾; 牛玉翠; 黄永红 [利用超低温保存方法脱除香蕉来顶病毒的研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2009(03)
4. Ashmore S; Saunders R; Drew R [In vitro conservation and cryopreservation of papaya](#) 2000
5. Towill L E; Bonnard R [Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips](#) 2003
6. 张守梅; 李建国; 陈厚彬 [香蕉种质超低温保存技术研究进展](#)[期刊论文]-[果树学报](#) 2005(05)
7. Kim H H; Lee J K; Hwang H S [Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique](#) 2007
8. Sant R; Panis B; Taylor M [Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro \(Colocasia esculenta var. esculenta\) accessions](#) 2008
9. 赵艳华; 周锡明; 吴永杰 [苹果离体茎尖超低温保存方法的比较](#)[期刊论文]-[园艺学报](#) 2003(06)
10. Leunufna S; Keller E R J [Investigating a new cryopreservation protocol for yams \(Dioscorea spp.\)](#) 2003
11. Pennycooke J C; Towill L E [Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato \[Ipomoea batatas\(L.\) \[Jam.\] by vitrification](#) 2000
12. Mix-Wagner G; Conner A J; Cross R J [Survival and recovery of Asparagus shoot tips after cryopreservation using the "droplet" method](#) 2000
13. Schafer-Menuhr A; Schumacher H M; Mix-Wagner G [Cryopreservation of potato cultivars: design of a method for routine application in genebanks](#) 1997
14. 王子成; 邓秀新 [玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生](#)[期刊论文]-[园艺学报](#) 2001(04)
15. Takagi H; Tien Thinh N; Islam O M [Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of taro \[Colocasia esculenta \(L\) Schott\] by vitrification](#) 1997
16. Crests S; Tulmann Neto A; Silva S O [Genetic characterization of banana cultivars \(Musa spp.\) from Brazil using microsatellite markers](#) 2003
17. 吴黎明; 曾继吾; 彭抒昂 [香蕉茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生](#)[期刊论文]-[园艺学报](#) 2006(03)
18. Panis B; Piette B; Swennen R [Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae](#) 2005

19. Thin N T;Takagi H;Yashima S Cryopreservatian of in vitrogrown shoot tips of banana (Muss spp.) by vitrification method 1999
20. Panis B;Totte N;Van Nimmen K Cryopreservation of banana(Musa spp.)meristem cultures after preculture on sucrose 1996
21. Panis B J;Withers L A;De Langhe E A L Cryopreservation of Muss suspension cultures and subsequent regeneration of plants 1990
22. Abdelnour-Esquivel A;Mora A;Villalobos V Cryopreservation of zygotic embryos of Muss acuminata (AA)and M. balbisiana (BB) 1992
23. Chin H F Germination and storage of banana seeds 1996
24. Ashmore S E;Azimi M;Drew R A Cryopreservation trials in Carica papaya 2001

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201001007.aspx