

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2023)05-0419-09

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2023.05.004

延长马铃薯种质资源低温保存条件的探究

陈汝豪¹, 周艳华¹, 赵喜娟¹, 焦文标¹, 宋波涛¹, 柴婷婷^{2*}

(1. 果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室/农业农村部马铃薯生物学与生物技术重点实验室/华中农业大学,

湖北 武汉 430070; 2. 湖北省农业技术推广总站, 湖北 武汉 430070)

摘要: 试管苗离体保存是马铃薯目前应用最广泛的种质资源保存方法, 探究延长试管苗继代周期的保存条件可以有效减少风险并降低保存成本。从实验室种质资源库中挑选了6个不同基因型的马铃薯材料, 以植株状态、株高和存活率作为指标, 探究不同预生根处理、保存温度、培养基蔗糖浓度和继代方式对马铃薯试管苗保存的影响, 以探索广泛适用于马铃薯试管苗长期低温保存的条件。不进行预生根处理的试管苗在低温保存的第60 d几乎不生长, 随后死亡, 说明预生根处理是试管苗低温保存的必要条件。4℃条件下试管苗的生长比7℃更缓慢, 在第90 d时的株高明显更小, 4个材料的试管苗存活率仅为53.75%, 而7℃条件下存活率为100%, 说明7℃更适于不同基因型马铃薯种质资源的低温保存。8%蔗糖浓度培养基中的试管苗在第90 d时的株高明显低于4%蔗糖浓度, 存活率统计显示4%蔗糖浓度培养基中的试管苗在7℃保存第270 d时全部死亡, 8%蔗糖浓度培养基中的试管苗存活率达到61.25%, 表明8%蔗糖浓度能明显延长马铃薯试管苗的低温保存时间。由此可见, 可以采用8%蔗糖浓度培养基和7℃环境温度用于大部分马铃薯株系的长期低温保存。此外, 探究了一种试管苗-组培盒苗交替继代培养的方法, 能有效改善长势弱的种质资源的保存, 将这些材料在低温保存第90 d的存活率从直接继代试管苗22.50%提高到试管苗-组培盒苗交替继代95.00%。此研究对优化马铃薯种质资源的长期保存条件具有重要的指导作用。

关键词: 马铃薯; 种质资源; 试管苗; 低温保存

Study on Conditions for Extending the Low temperature Preservation of Potato Germplasm Resources

CHEN Ruhao¹, ZHOU Yanhua¹, ZHAO Xijuan¹, JIAO Wenbiao¹, SONG Botao¹, CHAI Tingting^{2*}

(1. National Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops/Key Laboratory of Potato Biology and

Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China;

2. Agricultural Technology Extension Station of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: In the current potato germplasm resource preservation landscape, *in vitro* methods have gained widespread acceptance. Exploring the preservation conditions for extending the subculture cycle of test-tube seedlings can effectively reduce the risk and preservation cost. In this study, six different genotypes of potato materials were selected from the germplasm resources, and the effects of pre-rooting, temperature, sucrose concentration and subculture method on the preservation of potato test-tube seedlings were investigated using plant status, plant height and survival

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 湖北省支持种业高质量发展资金项目(鄂财农发函[2022]58号)。

作者简介: 陈汝豪(1990-), 男, 博士研究生, 主要从事马铃薯遗传育种和抗病毒研究。

*通信作者(Corresponding author): 柴婷婷, 硕士, 高级农艺师, 主要从事农业技术推广工作, E-mail: 21952122@qq.com。

rate as indicators to explore the widely applicable conditions for long-term low temperature preservation of potato test-tube seedlings. Test-tube seedlings without pre-rooting treatment showed minimal growth on the 60th day of low temperature preservation and eventually died, suggesting that pre-rooting treatment is essential for the successful low temperature preservation of test-tube seedlings. The growth rate of test-tube seedlings at 4°C was slower compared to those at 7°C, and the plant height was obviously smaller on the 90th day. However, the survival rate of test-tube seedlings from four different materials at 7°C was 100%, while it was only 53.75% at 4°C, indicating that a temperature of 7°C is more suitable for preserving potato germplasm resources with various genotypes. Furthermore, the plant height of test-tube seedlings in a medium with 8% sucrose on the 90th day was obviously lower than those with 4% sucrose. Survival statistics revealed that all test-tube seedlings in the medium with 4% sucrose died after being stored at a temperature of 7°C for 270 days, whereas there was still a survival rate of approximately 61.25% for those in an 8% sucrose concentration medium. These findings suggest that an 8% sucrose concentration could prolong the low temperature preservation time for potato test-tube seedlings. In short, using a sucrose concentration of 8% in combination with an ambient temperature of 7°C could be effective for long-term low temperature preservation of most potato lines. Additionally, a subculture method involving test tube culture seeding and alternate box culture seedling was explored, which effectively improved the preservation of weak-growth germplasm resources and increased their survival rate from 22.50% (test tube culture seeding) to 95.00% (alternate subculture of test-tube culture seedlings-box culture seedlings) on the 90th day of low temperature preservation. This research provides valuable guidance for optimizing the conditions required for long-term preservation of potato germplasm resources.

Key Words: potato; germplasm resource; test-tube seedling; low temperature preservation

作物种质资源是人类赖以生存和发展的重要物质基础和战略资源^[1]。马铃薯是中国重要的粮食作物之一,随着马铃薯产业发展和市场需求变化对品种特性提出更高要求,中国马铃薯育种研究面临着新的挑战,新品种选育至关重要。因此,马铃薯种质资源的搜集、保存和利用等一直被中国马铃薯育种者所重视^[1,2]。然而,中国马铃薯的种质资源研究仍远落后于部分发达国家,需要更多的投入和支持^[3]。

目前,马铃薯种质资源保存方法主要包括传统方法保存、超低温保存和试管苗离体保存等^[1,4]。传统田间种植保存主要采用马铃薯块茎保存,由于马铃薯含水量高、繁殖器官体积大,在贮藏过程中容易发芽,并且容易受到病虫害的侵扰,导致马铃薯贮藏和保护方面投入大量的人力、物力和财力^[5]。超低温保存是指在-80°C以下的极低温环境中保存种质资源的生物技术。通过超低温保存,可以极大延缓甚至停止材料的代谢和衰老过程,保持其稳定性,减少生理代谢和遗传变异的风险,并且可以减

少工作量和污染的机会^[6,7]。但目前超低温保存存在操作技术难度大、保存存活率低等问题,还无法广泛应用。试管苗离体保存是将马铃薯带腋芽的单节茎段转入玻璃试管以培养基不断继代培养的中短期保存方法,保存费用较低,相对节省空间,可以避免田间病害的侵染,是目前应用最广泛的马铃薯种质资源保存方法。但在不断继代培养过程中大批量样品的保存易导致材料的污染、混淆甚至丢失。探究如何延缓试管苗生长,延长每一次继代培养时间,对提高马铃薯种质资源保存效果有重要意义。降低温度是植物组织培养延长保存期的常用方法^[8]。然而,过低的温度又可能导致植株死亡,寻找合适的低温才能有效延长保存时间。马铃薯是喜冷凉作物,生长的最适温度为16~20°C,研究者们通常以4°C/2°C作为冷驯化温度^[9],4°C可能是保存马铃薯种质资源的低温阈值。蔗糖在马铃薯离体培养中起着重要的作用。适宜浓度的蔗糖可以为马铃薯试管苗提供充足的碳源,促进其正常的生长和发育,而高浓度的蔗糖可以通过渗透调节作用限制马铃薯试管

苗的生长^[10,11]。本研究以6个不同基因型的马铃薯株系试管苗为试验材料, 研究不同预生根处理、保存温度、培养基蔗糖浓度和继代方式对马铃薯试管苗保存效果的影响, 以探索广泛适用于马铃薯试管苗长期低温保存的条件, 为马铃薯种质资源保存提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自于农业农村部马铃薯生物学与生物技术重点实验室种质资源库, 包括品种‘中薯4号’和‘中薯19号’, 来源于杂交组合395049.20(E20)×395049.108(E108)^[12]的群体材料MT252和MT205, 来源于AC142和sm5083细胞融合的融合材料St142/sm5083-20-2和St142/sm5083-48-2。

1.2 试验方法

选取20~25 d生长健壮的组培苗, 由上至下剪取2个带腋芽的单节茎段插入含2 mL培养基的试管中。试验以MS培养基为基本培养基, pH为5.8, 琼脂浓度为8 g/L; 新茎段转入试管后, 将试管苗置于组培苗生长室(温度20℃, 光周期16 h/8 h, 光照强度400~1 000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)生长一周进行预生根处理, 待试管苗生根后转入低温冷库生长。

将继代于4%蔗糖浓度MS培养基的马铃薯试管苗, 分别进行预生根处理和不进行预生根处理, 并对比其在7℃冷库保存第60 d时的植株状态, 以探究预生根处理对试管苗低温保存的影响。

将继代于4%蔗糖浓度MS培养基的马铃薯试管苗, 预生根处理后分别放入20℃组培苗生长室(对照), 4℃和7℃冷库(光周期16 h/8 h, 光照强度400~1 000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)培养, 对比其在保存第90 d时的植株状态和株高, 并统计保存到第180 d时的存活率(每30 d统计一次), 以探究适合试管苗长期保存的低温条件。

将试管苗分别继代于含4%(40 g/L)和8%(80 g/L)蔗糖浓度的MS培养基中, 预生根处理后对比其在7℃冷库保存第90 d时的植株状态和株高, 并统计保存到第270 d时的存活率(每30 d统计1次), 以探

究蔗糖浓度对试管苗低温保存的影响。

将长势弱的马铃薯试管苗用两种方式继代, 其一为直接继代于含8%蔗糖浓度MS培养基的试管中, 预生根处理后转入7℃冷库, 另一种为试管苗-组培盒苗交替继代方式, 即将试管苗继代于含4%蔗糖浓度培养基的组培盒中, 在20℃组培苗生长室生长20 d后再继代于含8%蔗糖浓度MS培养基的试管中, 预生根处理后转入7℃冷库, 对比两种继代方式的试管苗在低温保存第60 d时的植株状态和株高, 并统计保存到第180 d时的存活率(每30 d统计1次), 以探究不同继代方式对长势弱试管苗低温保存的影响。

每个株系每种处理20支试管。

1.3 测定项目及方法

株高测定: 从每个株系每种处理20支试管中随机挑选5株, 用标尺测定株高; 对于长至顶部导致植株弯曲的植株, 将植株取出摆直后再用标尺测定。

存活率统计: 试管苗存活率(%) = 试管苗存活数(枯萎黄化即为死亡)/继代试管苗总数 × 100。

不同温度和蔗糖浓度处理的继代试管苗总数为4个株系试管苗总数共80支, 不同继代方式处理的继代试管苗总数为2个株系试管苗总数共40支。

1.4 数据处理

采用GraphPad Prism 9.3.1软件进行试验数据处理。用柱状图表示各处理各株系的株高, 误差线代表标准差($n = 5$); 用折线图表示各处理在不同天数时的试管苗存活率。

2 结果与分析

2.1 预生根处理对马铃薯试管苗低温保存的影响

相比于试管苗刚继代时的植株状态(图1A), 进行了预生根处理的试管苗在冷库中正常生长(图1B), 而不进行预生根处理的试管苗在培养后的第60 d几乎不生长, 且试管苗出现黄化或死亡现象(图1C)。说明根系对于维持试管苗在低温下的正常生长至关重要, 预生根处理是试管苗低温保存的必要条件。



注: A. 继代后第0 d的试管苗植株状态; B. 预生根处理试管苗低温保存第60 d的植株状态; C. 不预生根处理试管苗低温保存第60 d的植株状态。培养基为4%蔗糖浓度的MS培养基, 低温保存温度为7℃。照片为试管苗在冷库中保存第60 d拍摄。

Note: A. Status of test-tube seedlings on 0 day after subculture; B. Status of test-tube seedlings stored on the 60th day after subculture under low temperature with pre-rooting treatment; C. Status of test-tube seedlings stored on the 60th day after subculture under low temperature without pre-rooting treatment. The culture medium is MS medium with a concentration of 4% sucrose, and the low-temperature storage temperature is 7℃. The photo was taken on the 60th day after test-tube seedlings were stored in a cold storage.

图1 预生根处理对不同马铃薯株系低温保存的影响

Figure 1 Effect of pre-rooting treatment on low temperature preservation of different potato lines

2.2 不同温度对马铃薯试管苗保存的影响

4℃(图2A)和7℃(图2B)低温保存下马铃薯试管苗的生长都明显缓慢于常温条件(图2C), 随着温度的降低在保存第90 d时植株株高明显降低(图3), 说明降低温度能延长试管苗保存。对于个别比较强壮的植株, 4℃条件下试管苗生长相比7℃更缓慢, 更有利于试管苗的长期保存, 但总体而言, 其余试管苗状态也明显弱于7℃条件下生长的植株, 特别是本身植株生长较弱的株系(如‘中薯4号’), 试管苗容易黄化死亡(图2A、2B)。存活率统计结果表明低温相比常温条件能明显延长保存周期, 但4℃条件下在保存第90 d时存活率仅为53.75%, 而7℃条件下第90 d时试管苗存活率为100%, 在第180 d时存活率为95.00%, 说明7℃既能满足试管苗的低温长期保存, 又能避免某些较弱

的株系受低温胁迫而死亡, 更适于大量不同基因型马铃薯种质资源的低温保存(图4)。

2.3 不同蔗糖浓度培养基对马铃薯试管苗低温保存的影响

在继代后的第90 d, 试管苗在4%蔗糖浓度的培养基中已经生长接近试管顶部, 甚至开始结气生薯(图5A), 而试管苗在8%蔗糖浓度的培养基中生长至试管中部(图5B), 株高也明显低于4%蔗糖浓度培养基(图6), 表明8%蔗糖浓度明显减缓了试管苗的生长且不影响植株的正常生长。此外, 4%蔗糖浓度培养基中的试管苗在7℃保存150 d后存活率由93.75%迅速降低至0, 在第270 d时全部死亡; 而8%蔗糖浓度培养基中的试管苗在7℃保存第270 d时存活率仍能达到61.25%(图7), 表明8%蔗糖浓度能明显延长马铃薯试管苗的低温保存时间。

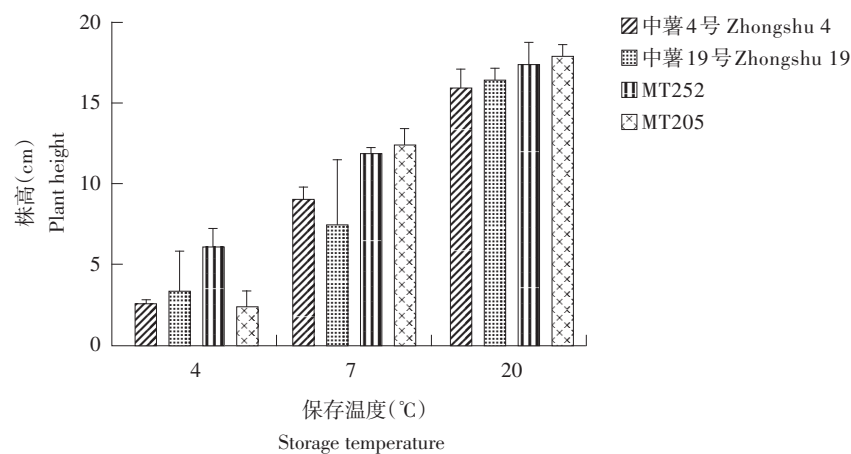


注：A~C分别为试管苗在4℃、7℃和20℃保存第90 d时的植株状态。培养基为4%蔗糖浓度的MS培养基，试管苗在预生根处理后转入冷库。

Note: A~C represents the status of the test-tube seedlings stored at 4℃, 7℃, and 20℃ for 90 days, respectively. The culture medium is MS medium with a concentration of 4% sucrose, and the seedlings were transferred to cold storage after pre-rooting treatment.

图2 不同温度对马铃薯试管苗保存的影响

Figure 2 Effect of different temperatures on preservation of potato test-tube seedlings



注：误差线代表标准差(n = 5)。下同。

Note: Error bar represents standard deviation (n = 5). The same below.

图3 不同温度下保存第90 d时试管苗株高

Figure 3 Plant height of test-tube seedlings stored at different temperatures for 90 days

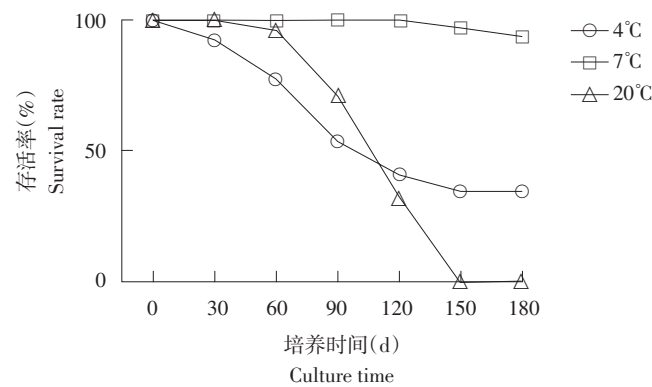
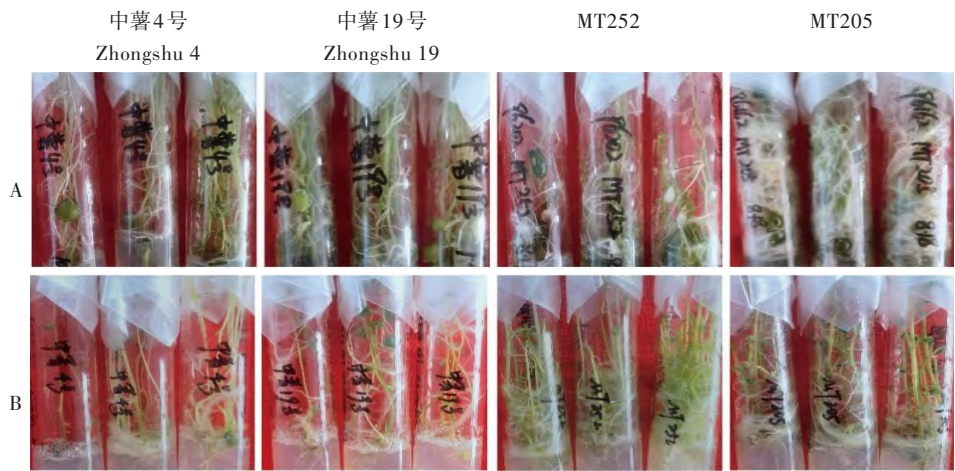


图4 不同保存温度对试管苗存活率的影响

Figure 4 Effect of different storage temperatures on survival rate of test-tube seedlings



注: A. 4%蔗糖浓度培养基培养第90 d时试管苗的状态; B. 8%蔗糖浓度培养基培养第90 d时试管苗的状态。低温保存温度为7℃。

Note: A. Status of the test-tube seedlings on the 90th day of culture with 4% sucrose concentration medium; B. Status of the test-tube seedlings on the 90th day of culture with 8% sucrose concentration medium. Cold storage temperature is 7℃.

图5 不同蔗糖浓度培养基对马铃薯试管苗低温保存的影响

Figure 5 Effect of different sucrose concentration mediums on low temperature preservation of potato test-tube seedlings

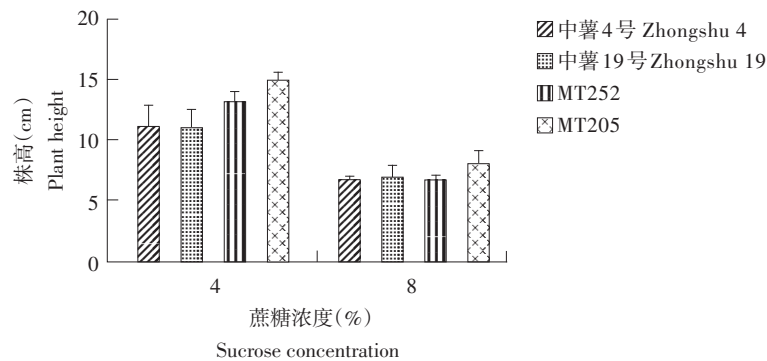


图6 不同蔗糖浓度培养基培养第90 d时试管苗株高

Figure 6 Plant height of test-tube seedlings on different sucrose concentration mediums for 90 days

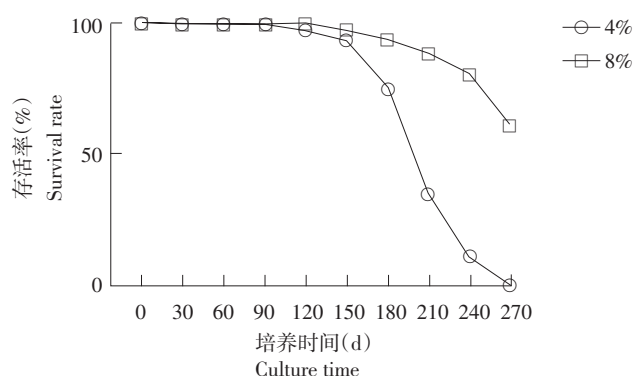


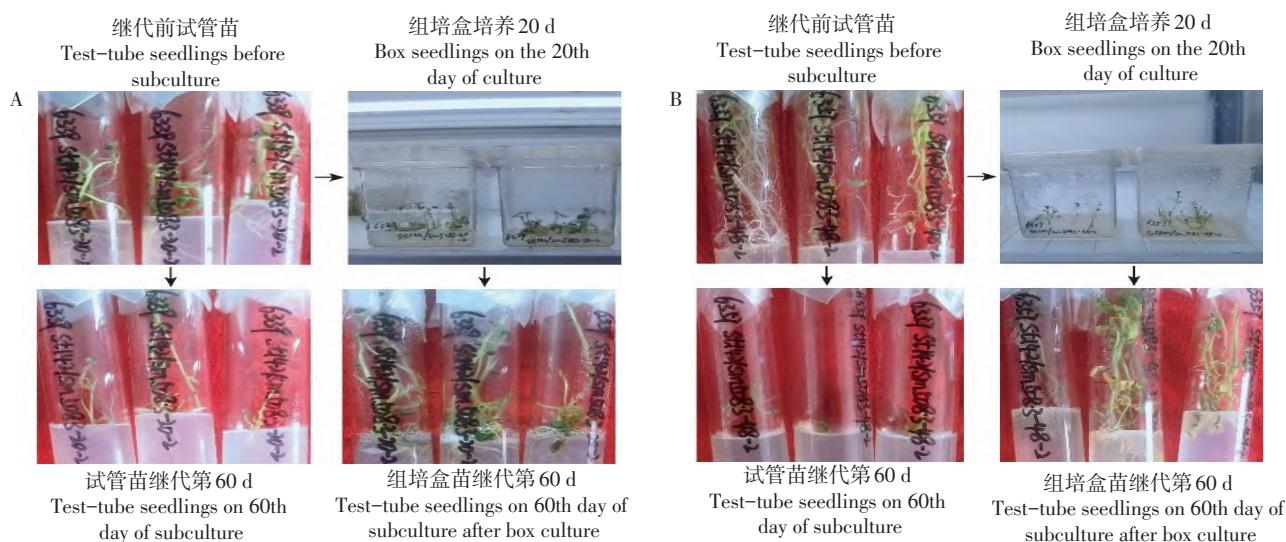
图7 不同蔗糖浓度培养基对试管苗存活率的影响

Figure 7 Effect of different sucrose concentrations mediums on survival rate of test-tube seedlings

2.4 不同继代方式对马铃薯试管苗保存的影响

2个融合材料试管苗在直接用试管继代的情况下, 生根情况差, 在保存的第60 d植株仍难以生长, 长势很弱, 如果不马上再进行继代容易死亡; 而先将试管苗继代于组培盒培养20 d后再转入试管后, 生根情况得到一定改善(图8), 试管苗在第60 d时的株高明显增加(图9), 说明试管苗-组培盒苗

交替继代确实能有效增强弱苗长势。另外, 直接继代的试管苗在7℃保存60 d后存活率由75.00%开始迅速降低至第90 d的22.50%, 随后全部死亡; 而试管苗-组培盒苗交替继代方式的试管苗在第90 d时存活率为95.00%, 并在180 d时仍有27.50%存活率(图10), 表明试管苗-组培盒苗交替继代方式能明显延长长势弱的马铃薯种质资源的低温保存时间。



注: A. 细胞融合材料St142/sm5083-20-2通过试管苗继代和试管苗-组培盒苗交替继代后在低温保存第60 d时的植株状态对比; B. 细胞融合材料St142/sm5083-48-2通过试管苗继代和试管苗-组培盒苗交替继代后在低温保存第60 d时的植株状态对比。培养基为8%蔗糖浓度的MS培养基, 试管苗在预生根处理后转入7℃冷库。

Note: A. Comparison of plant status of the cell fusion material St142/sm5083-20-2 after subculture of test-tube seedlings and alternate subculture of test-tube seedlings-culture box seedlings on the 60th day of low temperature preservation; B. Comparison of plant status of the cell fusion material St142/sm5083-48-2 after subculture of test-tube seedlings and alternate subculture of test-tube seedlings-culture box seedlings on the 60th day of low temperature preservation. The culture medium is MS medium with a concentration of 8% sucrose, and the seedlings were transferred to cold storage at 7℃ after pre-rooting treatment.

图8 不同继代方式对马铃薯试管苗保存的影响

Figure 8 Effect of different subculture methods on preservation of potato test-tube seedlings

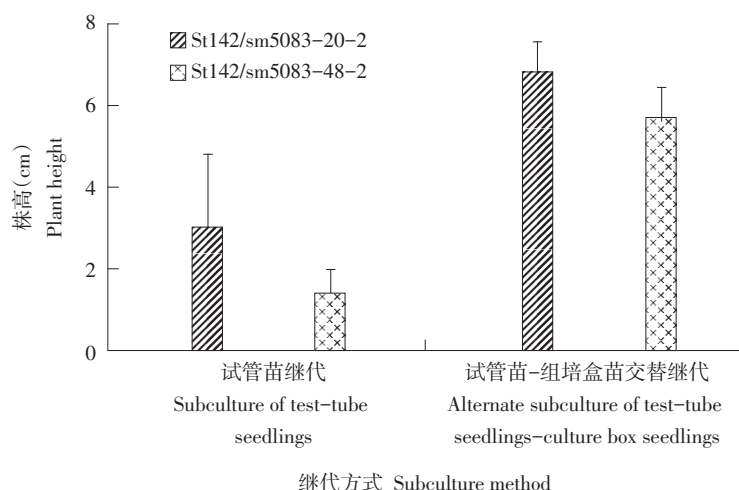


图9 不同继代方式试管苗在低温保存第60 d时株高

Figure 9 Plant height of test-tube seedlings with different subculture methods on the 60th day of low temperature preservation

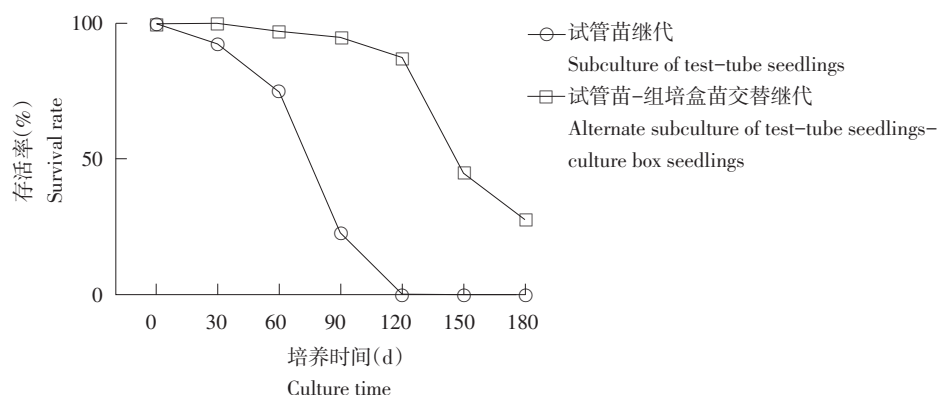


图10 不同继代方式对试管苗存活率的影响

Figure 10 Effect of different subculture methods on the survival rate of test-tube seedlings

3 讨论

随着马铃薯基因功能研究和育种工作的推进,需要不断的收集来自世界各地的马铃薯种质资源,或创造出新的种质资源,使得需要长期保存的材料越来越多。通常在常温情况下利用MS培养基保存组培苗以满足日常工作需要,继代周期一般为1个月。然而,频繁的继代过程中会因为污染等原因导致材料丢失。因此,需要通过试管苗低温保存抑制植株生长,以延长种质资源保存时间,减少继代次数。

前人的研究表明调节培养基渗透压(蔗糖浓度、琼脂浓度、山梨醇等),添加植物生长抑制剂(脱落酸,矮壮素等)以及降低温度等条件均可以抑制植株的生长,以延长试管苗保存时间^[13-16]。本研究主要从预生根、保存温度、蔗糖浓度和继代方式处理探索适合不同基因型马铃薯株系保存的条件,发现试管苗转入低温冷库保存前,在常温组培室中培养一周以促使试管苗生根对于植株在低温条件下的存活十分重要(图1);8%蔗糖浓度和7℃低温适合绝大多数马铃薯株系的保存(图2~7),在第270 d时仍

有61.25%的存活率(图7);对于某些长势弱的材料,可以通过试管苗-组培盒苗交替继代培养的方式来明显改善这些材料在低温冷库中的存活(图8~10),将这些材料在直接继代试管苗低温保存第90 d时22.50%存活率提高到试管苗-组培盒苗交替继代95.00%存活率,并在180 d时仍有27.50%的存活率(图10)。

虽然试管苗低温保存是目前经济有效的马铃薯种质资源保存方法,保存周期也相对较长,但大量材料的保存仍然使得继代工作繁重,仍不可避免遇到材料污染、遗失等情况而导致资源缺失。超低温保存理论上可以在保持材料遗传稳定性的同时实现无限期的保存时长,被视为迄今为止最理想的长期保存种质资源的方法。虽然国内外对马铃薯茎尖超低温保存的研究已有很多报道,但仍没有可广泛应用的马铃薯茎尖超低温保存技术^[17-19]。在不断摸索现有的最佳试管苗低温保存条件的同时,也需要加强对广谱性马铃薯超低温保存技术的研究,这对于中国马铃薯种质资源发展具有重要意义。

【参 考 文 献】

- [1] 邹剑锋. 用试管苗低温保存马铃薯种质及其遗传稳定性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [2] 王娟. 马铃薯种质资源保存试验[J]. 中国马铃薯, 2010, 24(5): 278-280.
- [3] 应静文. 马铃薯野生种 *Solanum boliviense* 抗寒种质资源的利用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [4] 杨小琴, 方玉川, 张艳艳. 马铃薯种质资源超低温保存技术研究进展[J]. 农业科技通讯, 2016(1): 3-5, 8.
- [5] 卞春松, 刘杰, 段绍光, 等. 马铃薯资源保存现状及方法的研究[C]//陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与科技扶贫. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2011.
- [6] 詹庭筑, 陆柏宪. 马铃薯茎顶组织超低温冷冻保存之研究[J]. 作物、环境与生物资讯, 2019, 16(3): 162-172.
- [7] 黄莓, 唐雪梅, 凌思琦, 等. 不同脱毒方法下马铃薯脱毒效果的比较研究[J]. 西昌学院学报: 自然科学版, 2022, 36(2): 1-4, 12.
- [8] 刘迎春. 马铃薯种质资源离体保存的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [9] 李飞, 刘杰, 段绍光, 等. 马铃薯幼苗在冷驯化期间的生理生化变化[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(5): 257-260.
- [10] 岳新丽, 湛润生, 帅媛媛, 等. 马铃薯种质离体保存技术[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(5): 257-259.
- [11] 刘江娜, 张西英, 赵亮, 等. 蔗糖对不同基因型马铃薯试管苗生长和长期保存的影响[J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2333-2340.
- [12] 周俊. 马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)试管块茎形成的QTL定位及遗传分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [13] 金山, 吴京姬, 康哲秀, 等. 琼脂浓度对马铃薯试管苗离体低温保存的影响[J]. 农业科技通讯, 2022(11): 121-123.
- [14] 刘一盛, 何卫, 王西瑶, 等. 山梨醇延长马铃薯试管苗低温保存的效应研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1038-1041.
- [15] Gopal J, Chamail A, Sarkar D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2004, 40: 485-490.
- [16] Gopal J, Sukh Chauhan N. Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature[J]. Potato Research, 2010, 53: 141-149.
- [17] 胡家金, 邹剑锋, 熊兴耀, 等. 玻璃化法超低温保存马铃薯茎尖的研究[C]//陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与冬作农业. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2006.
- [18] 宋继玲, 刘长臣, 孙邦升, 等. 基因库中马铃薯种质资源超低温保存技术研究[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(5): 268-270.
- [19] Kaczmarczyk A, Rokka V M, Keller E R J. Potato shoot tip cryopreservation. A review[J]. Potato Research, 2011, 54: 45-79.