

香蕉茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生

吴黎明^{1,2} 曾继吾¹ 彭抒昂² 易干军^{1*} 周碧容¹ 吴元立¹

(¹广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640; ²华中农业大学园艺林学学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 以香蕉 (*Musa* spp.) 为试材, 对其离体培养茎尖玻璃化法超低温保存影响因素进行研究。结果表明, 不定芽在 MS+3.0~5.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的培养基上分化较好。香蕉茎尖超低温保存较佳体系是: 2.0~3.0 cm 的茎尖在含 0.4 mol/L 蔗糖培养基上预培养 2 d, 剥取带 1~2 个叶原基的茎尖 (长 1.0~1.5 mm), 室温 (25℃) 下装载液 (MS+2 mol/L 甘油+0.4 mol/L 蔗糖) 装载 20~30 min, 然后用玻璃化溶液 (PVS₂) 于 0℃ 下处理 40 min, 换 1 次 PVS₂ 后迅速投入液氮。保存至少 1 h 后, 在 40℃ 水浴中化冻 90 s, 用 1.2 mol/L 蔗糖培养液洗涤 2 次, 每次 10 min, 然后转入含 0.3 mol/L 蔗糖的 MS 培养基上, 暗培养 10~15 h 后转移到含 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中, 暗培养 1 周后转移到正常光下, 3 个香蕉品种 (巴西蕉、广东香蕉 2 号、广东粉蕉 1 号) 的成活率分别为 75.9%、40.0% 和 69.6%, 再生率分别为 63.4%、35.0% 和 63.4%。再生植株生长和分化正常, 生根后可移栽成活。

关键词: 香蕉; 茎尖; 超低温保存; 玻璃化法

中图分类号: S 668.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0501-06

Cryopreservation of in Vitro Shoot Tips of Banana by Vitrification and Its Regeneration

Wu L iming^{1,2}, Zeng J iwu¹, Peng Shu'ang², Yi Ganjun^{1*}, Zhou B irong¹, and Wu Yuanli¹

(¹ Fruit Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangdong, Guangzhou 510640, China; ² College of Horticulture, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Shoot tips excised from healthy in vitro plants of three Banana cultivars were successfully cryopreserved with the vitrification technique. A suitable procedure was established as follows: 3 - 4 weeks after subculture, shoot tips about 2 - 3 cm in length were precultured for 2 days on MS medium supplemented with 0.4 mol/L sucrose. Dissected shoot apices about 1.0 - 1.5 mm in length with one or two leaf primordium were loaded with a mixture of 2 mol/L glycerol plus 0.4 mol/L sucrose for 20 - 30 min at room temperature. These excised shoot tips were sufficiently dehydrated in a highly concentrated plant vitrification solution for 40 min at 0℃. And then plunged directly into liquid nitrogen and conserved for at least 1 h. After rapid thawing in water at 40℃ for 90 s, the tips were rinsed with 1.2 mol/L sucrose solution for 20 min at room temperature and then plated on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 6-BA. The cryopreserved materials were cultured in darkness for one week so that they could grow quickly. Successfully cryopreserved shoot tips resumed growth within 10 days of plating and developed shoots within 1 month without intermediary callus formation. This simple protocol was successfully applied to the three cultivars belonging to two genomic groups of banana. The survival rate of shoot tips was 75.9%, 40.0%, 69.6%, and regrowth rate reached 63.4%, 35.0%, 63.4% respectively. Almost all the shoot tips formed roots and were successfully transferred to soil in pots. The plantlets could normally root and survive after transplantation.

Key words: Banana; Shoot-tip; Cryopreservation; Vitrification

香蕉种质保存通常采用建立种质资源圃, 进行田间活体保存。但该保存方法需要大量人力、物

收稿日期: 2005 - 06 - 11; 修回日期: 2005 - 10 - 02

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (05103391)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yiganjun@vip.163.com)

第一作者现工作单位: 湖北省农业科学院果树茶叶研究所

力,受多种外界环境条件影响,且易受到许多病虫害的侵袭,导致种质资源丢失。此外,常规离体保存需要经常继代,易污染和变异,有不可克服的缺点和不足。玻璃化法超低温保存是目前植物细胞和组织长期稳定保存的理想方法,能节省空间,避免污染和继代,克服体细胞变异,并且设备简单,操作简便。迄今,利用玻璃化法已成功保存了苹果、梨^[1]、杏^[2]、柑橘^[3]、柿^[4]、樱桃^[5]、马铃薯^[6]、番木瓜^[7]等离体茎尖。本研究以香蕉为试材,研究影响香蕉茎尖玻璃化法超低温保存的一些因素,以期对香蕉茎尖超低温保存提供理论和实践借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料及茎尖初始培养

供试材料采自国家种质资源广州香蕉圃,品种为:广东香蕉2号 [*Musa acuminata* (AAA group) 'Dwraf Cavendish']、Guangdong 2 '1、巴西蕉 [*Musa acuminata* (AAA group) 'Dwraf Cavendish']、Baxi '1、广东粉蕉1号 [*Musa xparadisica* (ABB group) 'Da Jiao']、Guangfen 1 '1。

以无病害的香蕉吸芽为材料,去掉根和外层叶鞘,用自来水冲洗干净,经常规灭菌后将茎尖接种在初代培养基上。香蕉最佳外植体为芽的顶端分生组织部分^[8]。诱导出芽的培养基以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA和NAA,蔗糖30 g/L,琼脂6.8 g/L,用1 mol/L的HCl或NaOH调节pH到5.8,经121 高压灭菌15 min。培养温度为(25 ±2),光照14 h/d。

1.2 玻璃化保存方法

1.2.1 茎尖剥离 选取继代培养20~30 d的健康植株,在无菌条件下取1.0~1.5 mm大小的茎尖,为防止茎尖干燥,剥离后立即置于0.1 mol/L蔗糖的MS培养基上。

1.2.2 茎尖预培养 将剥离的茎尖放在MS+2.0 g/L 6-BA+0.2 g/L NAA+5 g/L琼脂+0.4 mol/L蔗糖的培养基上进行预培养。预培养时间设(0、1、2、3、5、7 d)6个处理,然后对预培养中蔗糖浓度设(0、0.3、0.4、0.5、0.7 mol/L)5个处理。

1.2.3 装载 将预培养后的茎尖在室温下装载不同时间(0、20、30、40 min),装载液为MS+2 mol/L甘油+0.4 mol/L蔗糖,pH 5.8,并经高温灭菌。

1.2.4 脱水(Dehydration)处理 将茎尖从装载液中转移至无菌滤纸上停留30 s,然后转入低温(0℃)下,在玻璃化液(Plant Vitrification Solution, PVS₂)中进行脱水处理(0、10、20、30、40、50、60 min),PVS₂的成分为MS+30%甘油+15%乙二醇+15%二甲基亚砷+0.4 mol/L蔗糖,pH调至5.8,并经高温灭菌。

1.2.5 液氮保存 将处理后的茎尖装入2 mL冷冻管中,换1次新鲜PVS₂后迅速投入液氮(-196℃)中保存,保存时间不少于1 h。

以预培养蔗糖浓度、预培养时间、装载液处理时间、PVS₂处理时间4因素进行正交试验(每因素3个水平)并对4因素进行单因子试验,每处理至少10个茎尖,3次重复。

1.2.6 解冻处理和再培养 将材料从液氮中取出后,在40℃水浴中迅速解冻90 s,然后吸去PVS₂,用MS+1.2 mol/L蔗糖液洗涤两次,每次10 min。先在MS+0.3 mol/L蔗糖培养基上暗培养10~15 h后,再在MS+0.5 mg/L 6-BA的恢复培养基上暗培养1周,然后转入光下培养。半个月后统计成活率(转为绿色茎尖占每次试验材料总数的百分率),转为绿色为成活,否则为死亡;1个月后统计再生率(直接再生成芽的茎尖占每次试验材料总数的百分率),再生植株移入温室内栽培。

1.3 数据统计分析

试验结果由SAS 6.12版本统计软件分析,差异显著性采用邓肯氏新复极差测验方法来评估。

2 结果与分析

2.1 6-BA对香蕉茎尖离体培养的影响

3个香蕉品种茎尖接种到附加不同浓度的6-BA和NAA的培养基上培养,结果(表1)表明,6-BA

对茎尖有明显的促进作用，低浓度时产生的丛芽少，浓度高时丛芽增多，但超过 6.0 mg/L 时基部产生较多愈伤组织块，再生芽继代时不易切割，且生长较弱（图版，A、B）。3 个品种对 6-BA 浓度的反应也有区别，巴西蕉、广东香蕉 2 号以 5.0 mg/L 为佳，广东粉蕉 1 号则以 3.0 mg/L 较佳。

表 1 6-BA 对香蕉不定芽分化的影响
Table 1 Effect of banana shoot multiplication treated by 6-BA

处理号 Code	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	分化倍数 Multiple of buds			芽 Bud	愈伤块 Callus
			巴西蕉 Baxi(AAA)	广东香蕉 2 号 Guangdong 2 (AAA)	广东粉蕉 1 号 Guangfen 1 (ABB)		
	1.0	0.1	1.5	1.3	1.4	少 A few	无 No
	2.0	0.2	1.8	2.1	2.6	少 A few	无 No
	3.0	0.1	2.8	3.4	2.1	较多 More	无 No
	5.0	0.1	4.0	3.8	2.6	较多 More	少量 A little
	6.0	0.1	5.9	4.5	5.0	较多 More	较多 More

2.2 超低温保存正交试验结果

将预培养蔗糖浓度、预培养时间、装载液装载时间、PV S₂脱水时间 4 因素，按每因素 3 水平设计正交试验 L₉3⁴（表 2）。对数据进行分析（SAS 6.12 版本统计）显示，正交试验的 4 因子主次顺序为：PV S₂ 处理时间、蔗糖浓度、装载时间、预培养时间，4 因子各水平之间差异显著，试验的最佳处理组合是香蕉茎尖在含 0.4 mol/L 蔗糖培养基上预培养 2 d，室温下装载液装载 20 ~ 30 min，0 PV S₂ 处理 40 min。

表 2 超低温保存正交试验结果
Table 2 Results from orthogonal experiment

处理号 Treatment No.	蔗糖 Sucrose (mol/L)	预培养时间 Preculture time (d)	装载时间 Loading time (min)	PV S ₂ 处理时间 PV S ₂ treatment time (min)	成活率 Survival rate (%)
1	0.3 (1)	1 (1)	20 (1)	20 (1)	25.9
2	0.3 (1)	2 (2)	30 (2)	30 (2)	40.0
3	0.3 (1)	3 (3)	40 (3)	40 (3)	51.9
4	0.4 (2)	1 (1)	30 (2)	40 (3)	60.8
5	0.4 (2)	2 (2)	40 (3)	20 (1)	30.4
6	0.4 (2)	3 (3)	20 (1)	30 (2)	41.7
7	0.5 (3)	1 (1)	40 (3)	30 (2)	40.9
8	0.5 (3)	2 (2)	20 (1)	40 (3)	65.2
9	0.5 (3)	3 (3)	30 (2)	20 (1)	33.2
T ₁	39.3 b	42.5 b	44.2 a	29.8 c	
T ₂	44.3 a	45.2 a	44.7 a	40.9 b	
T ₃	46.4 a	42.3 b	41.1 b	59.3 a	

注：括号内数字表示处理水平。T 值表示同列中对应相同水平的平均值，同列内相同字母表示经邓肯氏新复极差测验在 0.05 水平上差异不显著。Note: The number in bracket means treatment level. T means the average percentages of the same level within columns. Difference within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

2.3 超低温保存单因子试验

设计单因子试验，利用正交试验结果，只变化单因子，其它处理按最佳处理组合进行。

2.3.1 预培养蔗糖浓度和预培养时间 预培养对提高植物材料超低温保存后的成活率有很大影响^[9]。本试验采用 MS 基本培养基附加不同浓度的蔗糖进行预培养。由图 1 可知，巴西蕉茎尖超低温保存成活率随蔗糖浓度的增加先增后减，当蔗糖为 0.4 和 0.5 mol/L 时，成活率分别为 75.9% 和 68.3%，当蔗糖为 0.7 mol/L 时，成活率降至 22.7%。同时，预培养时间也明显影响保存效果（图 2）。不进行预培养，保存后成活率仅为 38.4%，预培养 1 d，成活率为 62.7%，预培养 2 d，保存效果最好，成活率达 75.9%。但随着预培养时间延长，成活率迅速下降，当预培养 7 d 时，成活率仅为 28.2%，

对照也降至 53.3%。可能是茎尖在预培养过程中增强了细胞的渗透性,使茎尖能适应随后的 PVS_2 的快速脱水过程;而培养时间过长,蔗糖浓度过高,对细胞产生了渗透胁迫。

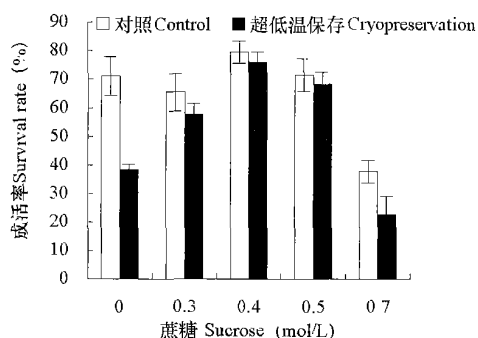


图1 预培养基中蔗糖浓度对成活率的影响

Fig. 1 Effect of different sucrose concentrations in solidified preculture medium on the survival rate

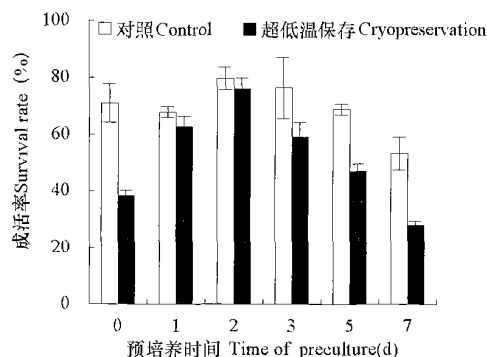


图2 预培养时间对成活率的影响

Fig. 2 Effect of different times of preculture in 0.4 mol/L sucrose medium on the survival rate

2.3.2 装载液装载时间 在用 PVS_2 进行快速脱水前,用高浓度的装载液 (MS + 2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖) 进行处理,以初步降低组织的含水量,从而可以避免由于渗透压变化太强而对材料造成的伤害。这是一个渗透保护的处理过程,Matsumoto等^[4]用此装载液处理柿的休眠芽茎尖,获得了极高的成活率 (92.5%)。本试验采用装载液对巴西蕉茎尖进行预处理,结果表明,预培养 2 d 后的茎尖在装载液中处理 20 ~ 30 min,保存后成活率可达 68.7%,而不处理的成活率仅为 25.8% (图 3)。

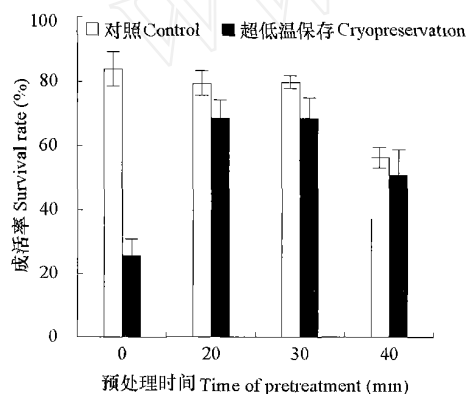


图3 装载液 LS 预处理对成活率的影响

Fig. 3 Effect of different time pretreatment with LS solution on survival rate

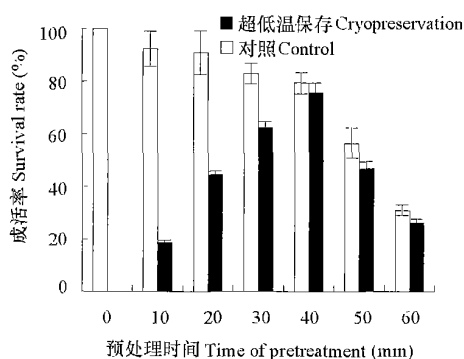


图4 PVS_2 处理时间对成活率的影响

Fig. 4 Effect of different time expose to PVS_2 on survival rate

2.3.3 PVS_2 处理 据报道, PVS_2 处理时间是影响超低温保存的关键因素^[10],在 0 条件下处理比在室温下可减轻冰冻保护剂对材料的毒害^[11]。本研究中将预培养和预处理后的巴西蕉茎尖在 0 条件下在 PVS_2 中处理 0 ~ 60 min,结果 (图 4) 表明,未经 PVS_2 处理的,保存后茎尖全部死亡;经 30 min 处理的,成活率为 62.6%,而处理 40 min 的高达 75.9%,但处理时间延长,成活率又迅速下降,60 min 时,降至 26.5%。同时,对照 (PVS_2 处理但未经液氮保存) 的成活率一直呈下降趋势,处理 60 min 后成活率低至 31.1%。其主要原因是 PVS_2 的二甲基亚砷的毒害和过度脱水对材料的伤害。

2.3.4 保护液 以广东粉蕉 1 号 (ABB) 茎尖为材料,研究不同冰冻保护液对香蕉超低温保存后成活率的影响。从表 3 可知, PVS_2 处理香蕉茎尖后,超低温保存后效果好,用 PVS_3 处理成活率为 0, PVS_1 和 PVS_2 的保存效果也不理想。因此, PVS_2 处理比较适应于香蕉超低温保存。

2.3.5 超低温保存时间 结果 (表 4) 表明,广东粉蕉 1 号 (ABB) 茎尖保存 1 h、1 d、1 周、10

周的成活率都在 60%以上, 彼此之间差异不显著, 说明香蕉在液氮中保存的时间长短不影响保存效果。理论上讲, 生物材料在液氮条件下, 其生理代谢基本停止, 所以保存时间长短不会影响保存结果, 这与 Niino 等^[5]所报道的樱桃超低温保存后的结果一致。

表 3 不同的超低温保护液对香蕉茎尖超低温保存后成活率的影响

Table 3 Effect of ABB shoot apices exposed to different cryoprotectant solutions on survival rate

处理 Treatment	甘油 Gly (%)	乙二醇 EG (%)	二甲基亚砷 DMSO (%)	蔗糖 Sucrose (mol/L)	PEG (%)	茎尖成活率 Survival rate (%)
PVS ₁	22	13	15		13	30.3 ±0.5 b
PVS ₂	30	15	15	0.40		69.6 ±2.5 a
PVS ₃	50			1.46		0 ±0 c
PVS ₄	35	20		0.60		2.2 ±3.9 c

表 4 超低温保存时间对成活率的影响

Table 4 Effect of different times conserving in liquid nitrogen on survival rate

保存时间 Conserving time	茎尖成活率 Shoot tips survival rate (%)
1 h	69.6 ±2.5 a
1 d	66.8 ±3.2 a
1 week	65.6 ±5.1 a
10 weeks	64.5 ±5.1 a

2.4 超低温保存后的形态发生和植株再生

将保存材料从液氮中取出, 迅速化冻并洗涤后, 接种到恢复培养基 (MS + 0.5 mg/L 6-BA) 上, 半个月后一部分茎尖呈白色或褐变, 一部分茎尖愈伤化, 分生组织和叶原基无序生长, 最后死亡, 大部分茎尖则直接成芽, 通过继代培养能再生成丛芽 (图版, C、D、E), 再生芽可在生根培养基上诱导生根 (图版, F), 经炼苗后移栽到温室, 再生植株在形态上与对照无异 (图版, G)。最后移栽到营养钵中进一步生长 (图版, H)。

2.5 香蕉茎尖超低温保存品种间的差异

应用正交试验和单因子试验优化的香蕉超低温保存条件和方法, 对三种香蕉品种的茎尖进行了超低温保存。由表 5 可知, 巴西蕉和广东粉蕉 1 号的成活率分别为 75.9% 和 69.6%, 再生率均为 63.4%, 而广东香蕉 2 号较低, 成活率和再生率仅为 40.0% 和 35.0%, 品种之间差异显著。

表 5 不同品种间应用超低温保存茎尖后的成活率和再生率的差异

Table 5 Survival and regeneration rate of cryopreservation shoot-tips from different cultivars of banana (%)

品种或基因型 Cultivars or genotype	成活率 Survival rate		再生率 Regeneration rate	
	超低温保存 Cryopreservation	对照 Control	超低温保存 Cryopreservation	对照 Control
巴西蕉 Baxi(AAA)	75.9 ±3.7 a	79.5 ±3.9 a	63.4 ±3.4 a	73.5 ±1.3 a
广东香蕉 2 号 Guangdong 2 (AAA)	40.0 ±2.5 c	83.6 ±4.7 a	35.0 ±3.9 b	73.5 ±4.0 a
广东粉蕉 1 号 Guangfen 1 (ABB)	69.6 ±2.5 b	79.9 ±2.0 a	63.4 ±7.0 a	69.8 ±3.0 a

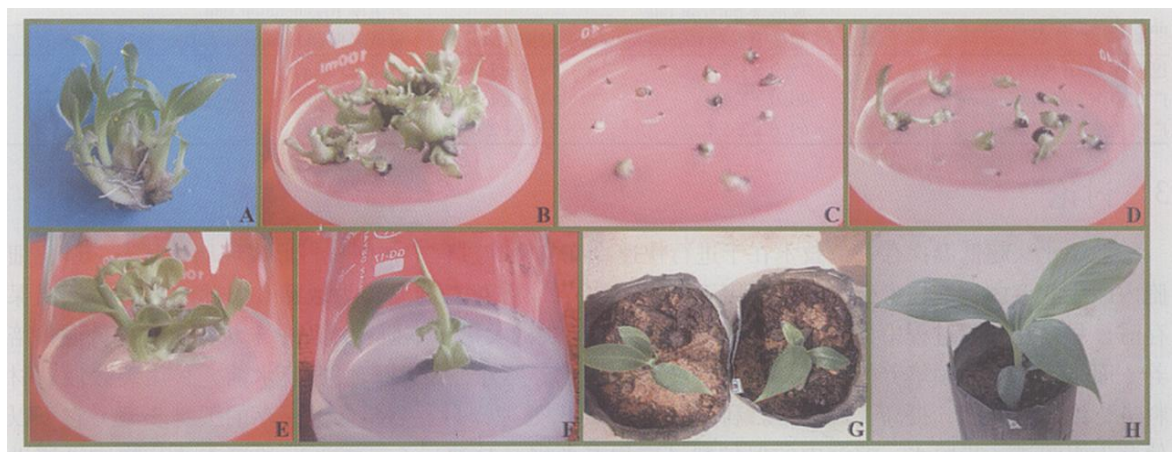
3 讨论

玻璃化法超低温保存关键技术在于进行快速冷冻及解冻过程中, 使材料形成玻璃化状态, 避免细胞内冰晶的形成, 该技术已经成功应用于多种果树^[11]。香蕉对低温较为敏感, 用此法进行超低温保存时, 材料在处理过程中如何诱导脱水是成功保存茎尖的关键。本研究过程中未对香蕉进行低温预培养, 而是采用高糖预培养的方式, 避免了冷害的发生。另外, 在 PVS₂快速脱水前, 采用装载液对材料进行渗透性处理, 提高了成活率。利用保护剂 PVS₂处理, 是香蕉超低温保存的关键步骤, 它可以使茎尖组织进一步脱水, 溶液中的保护剂 (二甲基亚砷、甘油、乙二醇等) 和渗透调节物质迅速进入到组织细胞中, 以便在快速冷冻时茎尖组织形成玻璃化状态, 减轻伤害, 达到保护的作用。

香蕉茎尖超低温保存后, 多数茎尖可以直接生长并再生成植株, 这种通过器官发生的途径可减少变异发生的频率。目前从再生植株的形态上看, 与对照无异, 但再生植株的遗传稳定性如何, 现正在从细胞及分子水平上进一步研究。超低温保存过程中, 导致茎尖死亡、愈伤化等原因, 有待从细胞显微及亚显微结构上进一步研究, 以探明相关机理, 以便优化超低温保存体系。

参考文献:

- 1 Niino T, Sakai A, Yakuwa H, Nojiri K. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28: 261 ~ 266
- 2 Channuntapipat C, Collins G, Bertozzi T, Sedgley M. Cryopreservation of in vitro almond shoot tips by vitrification. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000, 75 (2): 228 ~ 232
- 3 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑橘茎尖及植株再生. *园艺学报*, 2001, 28 (4): 301 ~ 306
Wang Z C, Deng X X. Cryopreservation of citrus shoot-tips by vitrification and regeneration. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28 (4): 301 ~ 306 (in Chinese)
- 4 Matsumoto T, Mochida K, Itamura H. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 398 ~ 402
- 5 Niino T, Tashiro K, Suzuki M. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Scientia Horticulturae*, 1997, 70: 155 ~ 163
- 6 Pennycooke J C, Towill L E. Cryopreservation of shoot tips in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 733 ~ 737
- 7 曾继吾, 易干军, 张秋明. 番木瓜茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生. *园艺学报*, 2004, 31 (1): 29 ~ 33
Zeng J W, Yi G J, Zhang Q M. Cryopreservation of in vitro papaya shoot tips by vitrification technique and its regeneration. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31 (1): 29 ~ 33 (in Chinese)
- 8 王昌虎, 马镇荣, 刘卫, 吴坤林, 张奕奇, 凌定厚. 应用正交设计方法优化香蕉外植体直接出芽的条件. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9 (1): 69 ~ 74
Wang C H, Ma Z R, Liu W, Wu K L, Zhang Y Q, Ling D H. Optimization for direct budding from explants in banana using orthogonal design. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2001, 9 (1): 69 ~ 74 (in Chinese)
- 9 Tskagi H, Tinh N, Islam O M. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of vitrification procedure. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 594 ~ 599
- 10 赵艳华, 吴永杰, 周明德. 马哈利樱桃离体茎尖超低温保存的研究. *园艺学报*, 1999, 26 (6): 402 ~ 403
Zhao Y H, Wu Y J, Zhou M D. Cryopreservation of in vitro culture shoot tips of *Prunus mahaleb*. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26 (6): 402 ~ 403 (in Chinese)
- 11 王军辉, 黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述. *园艺学报*, 1994, 21 (3): 277 ~ 282
Wang J H, Huang C N. Vitrification—a new approach for cryopreservation shoot-tips and meristems of horticultural crops. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21 (3): 277 ~ 282 (in Chinese)



图版说明: A. 茎尖继代产生的丛生芽; B. 6-BA浓度过高时的增殖情况; C、D. 超低温保存后茎尖直接成芽 (C 恢复培养 3周; D. 恢复培养 6周); E、F. 超低温保存苗的增殖、生根情况; G. 再生植物移栽入温室, 左边为对照; H. 超低温保存后在温室中生长两个月的情况。

Explanation of plates: A. Cluster buds of banana derived from tissue culture; B. Proliferation of banana on MS medium supplemented with higher 6-BA concentrations; C. Regeneration plantlets derived from cryopreserved shoot-tips (3 weeks); D. Regeneration plantlets derived from cryopreserved shoot-tips (6 weeks); E and F. Proliferation and rooting of plantlets after cryopreservation; G. Transplantation in greenhouse, left untreated control; H. Regeneration plantlet developed from cryopreserved shoot-tips after two months