

## 작은방울—유리화법에 의한 국화 신초의 초저온동결보존

이윤걸<sup>1,2</sup> · 박상언<sup>2\*</sup> · 김행훈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>충남대학교 농학과

### Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips using the droplet-vitrification technique

Yoon-Keol Lee<sup>1,2</sup>, Sang-Un Park<sup>2\*</sup>, Haeng-Hoon Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, RDA, Korea

<sup>2</sup>Department of Crop Science, ChungNam National University, Daejeon, Korea

Received on 19 April 2011, revised on 11 May 2011, accepted on 20 June 2011

**Abstract :** This study aimed at developing cryopreservation protocol for chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev cv. peak) shoot apices based on droplet-vitrification procedure, which is a combination of droplet-freezing and solution based vitrification. Progressive preculture of shoot apices in liquid MS medium supplemented with 0.3 and 0.7 M sucrose for 31 and 17 hours, respectively, was found optimum among preculture treatments tested. The composition of both loading and vitrification solutions significantly affected recovery growth of shoot tips before and after cryopreservation. Balancing glycerol and sucrose concentrations in the solutions was beneficial for recovery growth. The highest recovery after cryopreservation was observed when apical shoot tips were extracted from 4-week-old in vitro plantlets, progressively precultured with 0.3-0.5-0.7 M sucrose for 32-16-6 hours, respectively, then treated with loading solution comprising of 1.9 M glycerol + 0.5 M sucrose (35% PVS3 solution). Apices were then dehydrated with the vitrification solution consisted of 50% glycerol + 50% sucrose for 90 minutes then directly immersed in liquid nitrogen.

**Key words :** *Dendranthema grandiflora*, Loading solution, Preculture, Vitrification solution.

## I. 서론

국화는 2천년 이상의 재배 및 육종의 역사를 가진 가장 오래된 화훼작물종의 하나로서 현재도 유럽과 일본 등 전세계적으로 육종되고 널리 재배되고 있다. 국제 화훼시장에서 소비자들의 요구는 자주 급속하게 바뀌고 있고 신품종이 시장에 소개되면 오래된 품종들은, 유행이 지난 품종들이 미래에 중요해지기도 함에도 불구하고, 자주 급속하게 사라지게 된다. 따라서 영양체 유전자원의 유일한 장기 보존방법으로 간주되고 있는 초저온동결보존법의 개발 및 실용화는 육종가들 뿐만 아니라 재배자에게도 변화하는 시장수요에 신속하게 대응하기 위한 중요한 수단이 될 수 있다(Halmagyi 등, 2004).

국화는 유전적 균일성을 고려해서 포장에서 영양체 자원으로 유지보존되고 있어서 생리적, 병리적 퇴화 등으로 인한 소실이 우려되며, 많은 유지비용을 부담해야 한다. 이를 극복하기 위해 냉각속도 조절에 의한 slow-freezing(Fukai, 1990; Halmagyi 등, 2004), 전배양(Hitmi 등, 1999), 알긴산 코팅 및 탈수처리에 의한 encapsulation-dehydration (Sakai 등, 2000; Halmagyi 등, 2004; Martin and Gonzalez-Benito, 2005), 고농도의 유리화용액에서의 탈수에 의한 vitrification(Ahn and Skai, 1994; Sakai 등, 2000; Halmagyi 등, 2004; Martin and Gonzalez-Benito, 2005), 알루미늄 호일을 이용한 작은방울 동결법인 droplet-freezing (Halmagyi 등, 2004) 등 액체질소(-196°C)의 초저온에 장기보존하는 다양한 방법들이 시도되었으나, 아직 동결보존의 실용화 사례는 없는 것으로 알려져 있다.

유리화법에 기반을 둔 초저온동결보존에 있어서 샘플 안

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5730

E-mail address: supark@cnu.ac.kr

에 있는 얼 수 있는 거의 모든 물을 제거하는 것이 필수요건이기 때문에(Engelmann, 2000), 고농도의 동결보호제 혼합액인 유리화용액에서의 탈수과정을 포함한다. 따라서 적절한 유리화용액의 선정과 유리화용액에서의 탈수시간이 동결보존한 마늘 신초의 재생에 가장 크게 영향하는 요인이다(Kim 등, 2006a). 식물의 동결보존에 사용된 유리화용액중 PVS2(30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 0.4 M sucrose, Sakai 등, 1990)는 200 종/품종의 신초에 성공적으로 적용되는 등 가장 널리 사용되어왔다(Sakai and Engelmann, 2007). PVS3(Nishizawa 등, 1993) 또한 고추냉이(Matsumoto 등, 1995), 아스파라거스(Nishizawa 등, 1993) 및 마늘(Kim 등, 2004) 등에 사용되었다. Fahy 등(2004)은 복잡하고 공간적으로 확장된 생물체계의 동결보존에 있어서 동결보호제의 독성이 가장 중요한 장벽이 되고 있다고 지적하였는데, 독성은 주로 침투성 동결보호제로 인해 발생한다고 알려져 있다(Fahy 등, 1984; Fahy 등, 1990).

고농도의 유리화용액에서 직접 접촉함으로써 받는 독성을 완화시킴으로써 동결보존 후의 재생율을 향상시키기 위해 탈수처리 직전에 유리화용액보다 저농도의 동결보호제용액에 침지하는데 이때 사용하는 용액이 로딩용액이다(Matsumoto 등, 1994; Hirai and Sakai, 2000). 2 M glycerol + 0.4 M sucrose 용액(Nishizawa 등, 1993; Matsumoto 등, 1994)이 가장 널리 사용되었으나, 그 외에도 2 M glycerol + 0.5 M sucrose(Kim 등, 2006b), 2 M glycerol + 0.6 M sucrose(Hirai and Sakai, 2000), 20-60% PVS2(Sakai 등, 1990) 등 다양한 로딩용액이 사용되어왔다.

작은방울-유리화(droplet-vitrification)법은 작은방울-동결(droplet-freezing)법과 용액에 기반을 둔 유리화법(vitrification)을 혼합한 형태의 기술로서 고농도의 유리화용액에서 탈수처리한 시료를 알루미늄 호일 절편에 얹어서 액체질소에 직접 침지함으로써 cryovial에 넣어 침지할 때보다 냉각 및 해동속도를 향상시킴으로써 재생률을 향상시킬 수 있는 기술로(Kim 등, 2006b), 최근 유망기술로 각광받고 있다.

본 연구는 유리화법에 기반을 둔 동결보존에 있어서 생존율에 영향하는 주요 요인인 신초의 전배양조건, 로딩용액 및 유리화용액의 조성, PVS3 용액에서의 탈수시간 등을 최적화하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 전배양

국화(*Dendranthema grandiflora* Tzelev cv. peak) 기내유식물의 정아를 이용하였다. 마디를 적출하여 0.15 mg/L indole acetic acid(IAA) + 0.02 mg/L zeatin이 첨가된 MS 배지에서 25°C, 16시간 일장으로 7주 배양한 후 정아(길이 2 mm, 폭 1-1.5 mm)를 적출하였다. 정아를 0.3 M sucrose가 첨가된 MS 배지에 31시간 - 0.5 M sucrose에 18시간 - 0.7 M sucrose에 8시간 전배양하였다.

### 2. 작은방울-유리화법에 의한 동결보존

전배양 한 국화 신초를 로딩용액(MS 배지 + 2 M glycerol + 0.6 M sucrose)에 실온에서 40분간 배양한 다음 유리화용액인 PVS2(30% w/v glycerol + 15% w/v ethylene glycol + 15% w/v DMSO + 13.7% w/v sucrose)에 25분 또는 PVS3(50% w/v glycerol + 50% w/v sucrose)에 90분간 탈수처리하였다. 알루미늄호일 절편 위에 탈수처리한 신초를 얹어서 액체질소에 직접 침지하였고 적어도 24시간 이상 저장하였다. 해동을 위해 시료가 얹어져있는 알루미늄 호일을 40°C로 데운 언로딩 용액(0.8 M sucrose)에 직접 침지한 다음 추가로 차가운 언로딩 용액을 부어 40분간 유지하였다. 신초를 꺼내서 멸균한 여과지 위에서 물기를 제거한 다음 재생배양배지(MS 배지 + 0.1 mg/L IAA + 0.3 mg/L zeatin + 0.05 mg/L GA<sub>3</sub> + 15 mg/L putrescine + 30 g/L sucrose + 2.0 g/L Phytigel (pH 5.8))에서 25°C에 초기 5-7일간은 암상태에서 이 후에는 16시간 일장으로 배양하였다.

### 3. 생존율 및 재생율 조사

동결보존 2주 배양 후 녹색을 띤 신초가 3 mm 이상 나온 개체를 생존한 것으로 조사하였고, 재생율은 재생배양 6주 후 유식물체(10 mm 이상)를 형성한 개체의 비율을 조사하였다. 생존율 및 재생율 조사는 처리당 10-15개 신초씩 4반복 실험한 평균±표준편차로 표시하였다. 통계처리는 SAS 9.1 프로그램을 이용한 t-검정 결과를 95% 유의수준( $P < 0.05$ )에서 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 신초 적출시기

국화 기내 유식물 정아의 시료채취를 위한 최적 계대배양 주기를 구명하고자 마디배양기간에 따른 동결보존 전 (-LN) · 후(+LN)의 생존율(surv)과 재생율(rege)을 조사하였다(Fig. 1). PVS3 유리화용액에서 90분간 탈수시킨 탈수-LN 무처리(-LN)에서는 계대배양 4주 처리구에서 100%의 생존율과 86.3%의 재생율로써 가장 양호하였고, 배양기간이 길어질수록 감소하였다. 동결보존 후에는 4주와 5.5주의 생존율(87.7%, 85.4%)과 재생율(66.7%, 64.6%)이 가장 높았고, 7주, 8.5주로 길어질수록 재생율이 감소하였다.

#### 2. 전배양 조건

국화 기내 유식물 정아의 전배양(pre-culture) 조건에 따른 동결보존 전(-LN) 후(+LN)의 생존율(surv)과 재생율(rege)을 조사하였다. 0.3 M sucrose와 0.7 M sucrose의 2단계 전배양 체계에서 0.3 M sucrose에서의 배양시간

을 31시간으로 고정하고 0.7 M sucrose에서의 배양시간을 비교한 결과(Fig. 2), 동결보존 전(-LN) · 후(+LN) 모두 17시간 처리구에서 가장 높은 63%, 41.6%의 재생율을 보였고 7시간 또는 31시간 처리구는 재생율이 낮아졌고 무처리구에서는 10%의 가장 낮은 재생율을 나타냈다. 이 결과는 동결보존 후의 재생을 위해 0.7 M sucrose 용액에서의 배양이 필수적이라는 점과 이 용액에서의 삼투스트레스가 심해서 배양시간이 1일 이상으로 길어질수록 오히려 재생율이 감소한다는 것을 보여준다.

위 실험의 결과에 따라 0.7 M sucrose에서의 배양시간을 17시간으로 고정시키고 0.3 M sucrose에서의 배양시간을 비교한 결과(Fig. 3), 동결보존 후의 생존율은 31시간, 55시간, 7시간, 79시간의 순으로 높은 생존율을 보인 반면, 재생율에서는 79시간, 55시간, 31시간 간에는 유의성이 인정되지 않았고, 7시간 처리구에서는 가장 낮은 재생율을 나타냈다. 그러나 79시간, 55시간 처리구에서는 다신초의 형성빈도가 높고 다소 얼음 든 것처럼 자란 신초가 많은 반면, 31시간 처리에서는 무처리구와 비슷하게 정상 생장을 하였기 때문에 0.3 M sucrose 31시간을 최적조건으로 선정하였다.

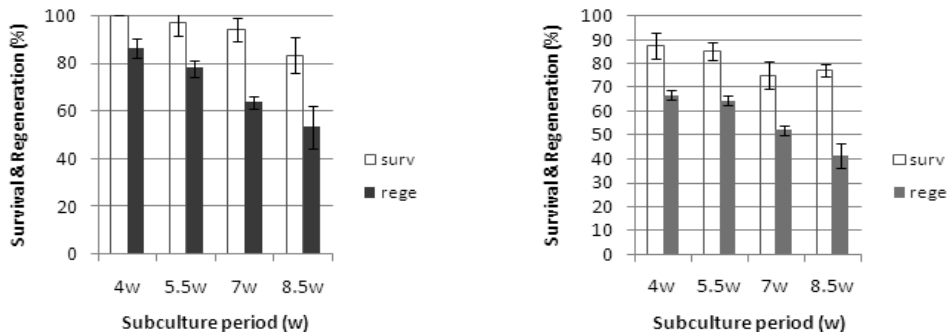


Fig. 1. Effect of subculture duration of donor plants on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.

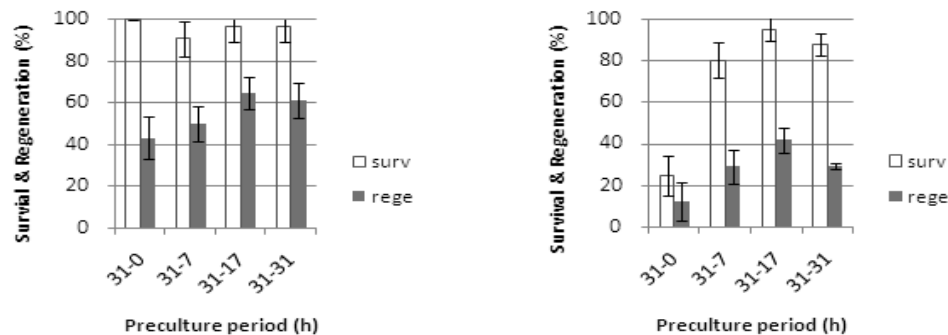


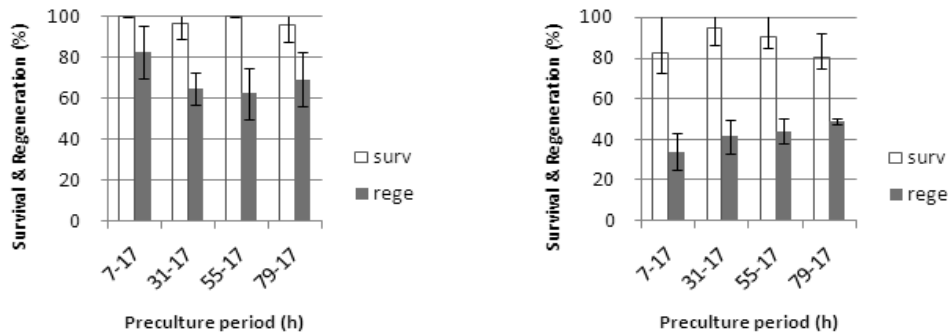
Fig. 2. Effect of preculture duration with 0.7 M sucrose in combination with preculture with 0.3 M sucrose for 31 hours on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.

전배양에 의한 삼투스트레스를 줄이기 위해 0.5 M sucrose 를 추가한 0.3 M - 0.5 M - 0.7 M sucrose 용액에서의 3단계 전배양 체계에서는 탈수 후 동결보존 전(-LN)과 후 (+LN)에 모두 32-12-6시간 및 32-0-18시간 처리구에서 가장 높은 재생율을 보였으며, 특히 32-12-6 시간 처리구에서는 다신초 형성이 줄어들고 무처리와 유사한 정상 개체로 성장하였다(Fig. 4). 0.3 M sucrose에서의 배양기간이 24시간 이하로 줄어들거나 0.7 M sucrose 에서의 배양을 거치지 않을 경우는 동결보존 후 재생율이 감소하였다.

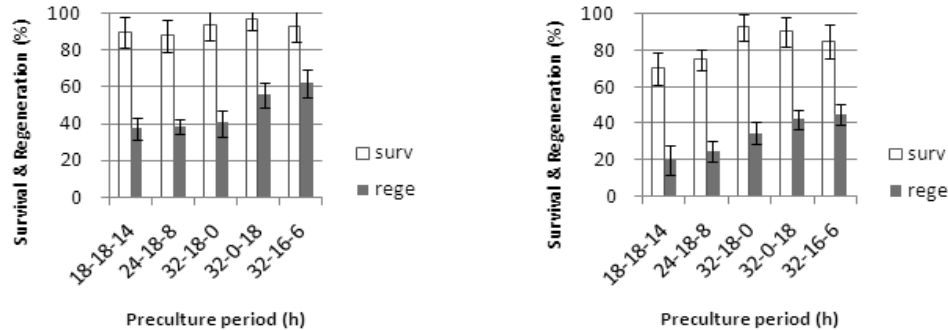
이는 삼투스트레스에 대한 저항성을 키우는데 0.3 M sucrose 에서의 충분한 기간동안의 전배양과 함께 0.7 M sucrose 에서의 전배양이 필요함을 보여준다.

### 3. 로딩 용액

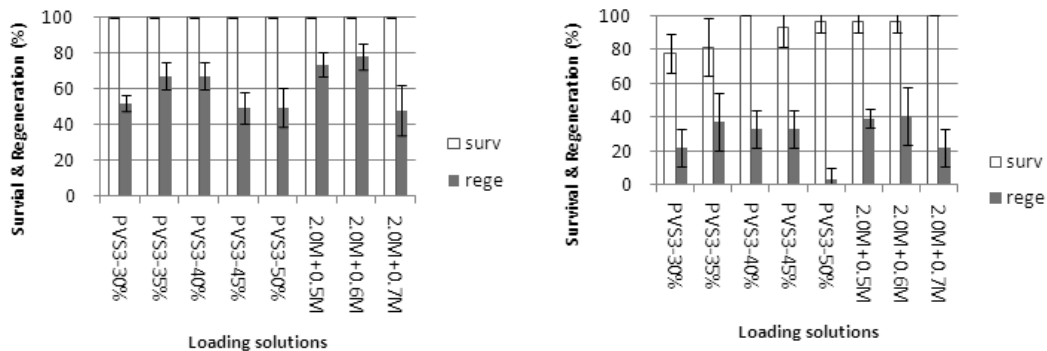
로딩용액의 조성은 동결보존 전(-LN) · 후(+LN) 국화 신초의 생존율에는 유의한 차이가 없으나 재생율에는 유의한 차이를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 동결보존 후의 재생율에서



**Fig. 3.** Effect of various preculture duration with 0.3M sucrose in combination with preculture with 0.7M sucrose for 17 hours on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.



**Fig. 4.** Effect of duration of the progressive preculture with 0.3 M, 0.5 M and 0.7 M sucrose, respectively, on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.



**Fig. 5.** Effect of loading solutions on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.

는 2 M glycerol + 0.5-0.6 M sucrose 용액이 가장 높았으며, PVS3 유리화용액의 희석액 중에서는 35-40% 희석액이 가장 높은 재생율을 보였다(그림 5).

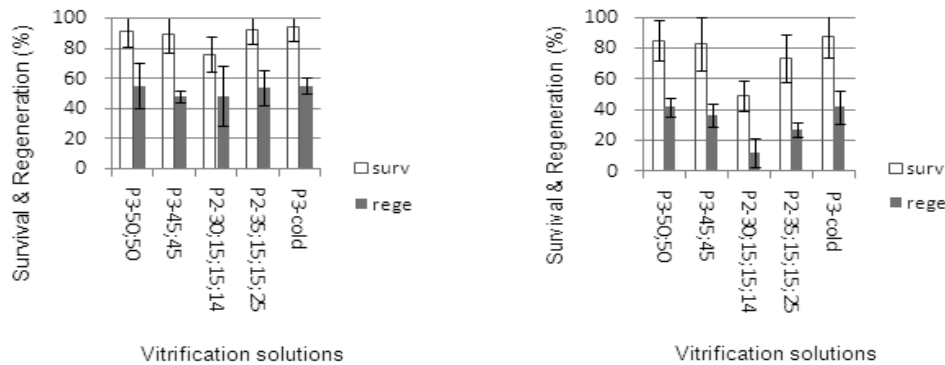
#### 4. 유리화 용액

저독성, 고효율의 유리화용액을 선별하기 위해 PVS2 및 변형용액에 25분 또는 PVS3 및 변형용액에 90분 탈수처리한 결과, 탈수-LN 무처리에서는 두 용액 그룹간의 재생율에 유의한 차이가 인정되지 않았으나, 동결보존 후에는 PVS3 (50% glycerol + 50% sucrose)와 변형용액(90% PVS3)이 각각 41.6%와 36.4%의 재생율을 보여 각각 12.0%와 26.8%를 보인 PVS2 및 PVS2 변형용액(35% glycerol + 15% DMSO + 15% ethylene glycol + 25% sucrose) 보다 높은 재생율을 보였고 신초형성도 다소 빨랐다(Fig. 6). 특히, 현재 식물 동결보존에 가장 널리 사용되고 있는 PVS2 용액(30% glycerol + 15% DMSO + 15% ethylene glycol + 14% sucrose)은 동결보존 전과 후 모두 가장 낮은 생존율

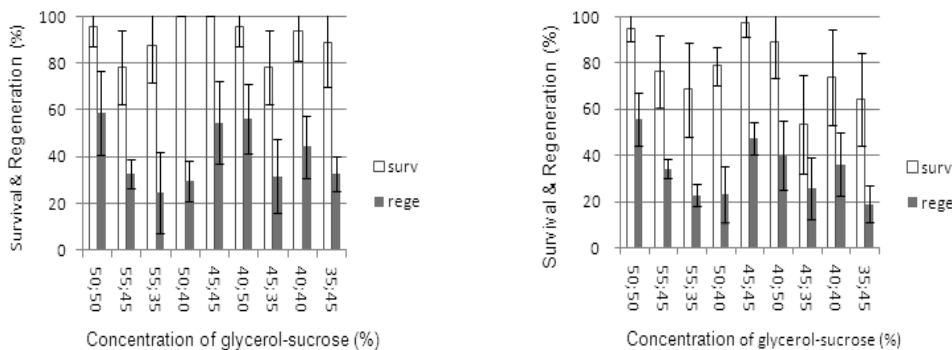
을 보였고, 동결보존 후의 재생율도 현저히 낮았다. 이 결과로 보아 PVS2 용액이 동결보호제의 화학적인 독성이 심해서 국화 신초에 적합하지 않음을 알 수 있다.

한편, 10°C에서의 저온처리(P3-cold)는 동결보존 전·후의 생존율 및 재생율 향상에 효과가 인정되지 않았다.

앞의 실험결과 가장 효과적이었던 PVS3 용액의 glycerol 과 sucrose 조성을 달리하여 비교한 결과, 50% glycerol + 50% sucrose이 95%의 생존율과 55.6%의 재생율로써 가장 양호하였다(Fig. 7). 전체적으로 동결보존 전(-LN)과 후(+LN) 모두 전체 농도 100% > 90% > 80% 순으로 높은 재생율을 보였고, 동일한 농도에서는 glycerol과 sucrose의 농도가 1:1로 균형을 맞춘 용액들이 높은 재생율을 보였다. 특히, glycerol과 sucrose의 농도가 균형을 잃은 용액들의 경우 탈수처리까지만 한 탈수-LN 무처리구(-LN)에서도 낮은 재생율을 보인 것으로 보아 유리화용액의 독성이 재생을 저하의 주요 원인이며 glycerol과 sucrose의 균형이 중요함을 알 수 있었다.



**Fig. 6.** Effect of vitrification solutions on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.



**Fig. 7.** Effect of vitrification solutions composed by glycerol and sucrose on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.

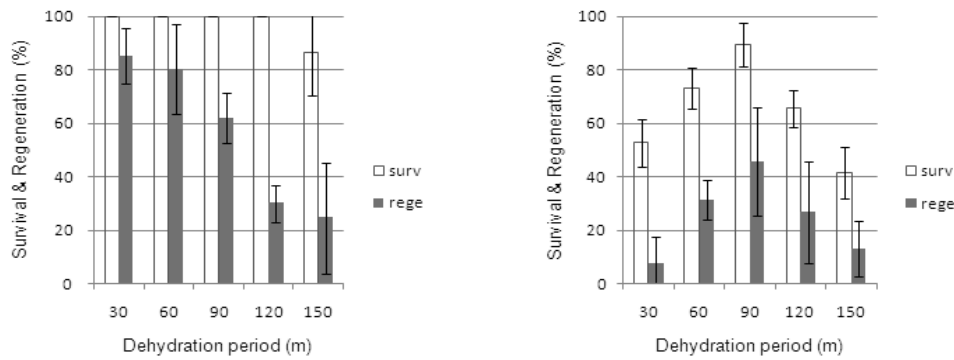


Fig. 8. Effect of dehydration duration with PVS3 vitrification solution on survival (surv) and regeneration (rege) of chrysanthemum shoot apices before (left, -LN) and after (right, +LN) cryopreservation.

앞의 실험 결과 선발된 PVS3 유리화용액에서의 탈수시간에 따른 생존율과 재생율을 비교한 결과, 탈수시간이 길어질수록 탈수처리한 국화 신초의 재생율이 감소하여 90분 이후에는 재생율이 급감하였다(Fig. 8). 동결보존 후의 생존율과 재생율은 탈수시간이 길어질수록 증가하여 90분 처리구에서 각각 89.4%와 45.6%로 가장 높았다가 120-150분 처리구에서는 다시 감소하였다. 탈수시간 60분까지는 주로 결빙형성에 의한 동결장해 때문에 생존율과 재생율이 감소하였고, 90분 이상의 탈수처리에서는 동결보호제의 독성이 생존율과 재생을 저하의 주요 원인인 것으로 여겨진다.

본 연구의 계대배양기간을 제외한 모든 실험에서 최적조건에서의 동결보존 후 재생율이 50% 이하로 낮은 것은 정아의 적출 전 적정 계대배양기간인 4-5.5주(Fig. 1)보다 긴 7주 배양 후 정아를 적출하였기 때문으로 판단된다. 이와 같은 경향은 감자에서도 보고된 바 있다(Yoon 등, 2006). 국화의 정아는 삼투스트레스에 민감하여 0.3-0.5-0.7 M sucrose의 3단계 전배양조건에서 가장 양호한 재생율을 보였으며, PVS2 유리화용액의 화학적 독성에도 매우 민감하여 PVS3 유리화용액에서 가장 높은 재생율을 보였다.

#### IV. 결론

본 연구는 작은방울-유리화법에 기초하여 국화 신초 정아의 초저온동결보존 프로토콜을 개발하고자 실시하였다. 작은방울-유리화법은 작은방울-동결법과 유리화법을 혼합한 형태의 기술로서 최근 각광받고 있다. 본 연구에서 최적의 동결보존 조건은 다음과 같이 정아 적출 후 점진적으로 sucrose 용액의 농도를 올리는 전배양, 로딩 및 탈수

를 거친 후 알루미늄 호일에 얹어서 액체질소에 직접 급속 동결하여 보존했다가 열을 가한 언로딩 용액에 직접 침지하여 해동하는 방법이었다. 정아의 적정 적출시기는 계대배양 4주 후였고, 정아의 최적 전배양 조건은 0.3 M - 0.5 M - 0.7 M sucrose 용액에 각각 32 - 16 - 6시간이었다. 최적 로딩용액은 35% PVS3 용액(17.5% glycerol + 17.5% sucrose)였고, 최적의 탈수조건은 PVS3 유리화용액(50% glycerol + 50% sucrose)에 90분간 현탁배양하는 것이었다.

#### 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원의 재정지원으로 수행된 결과입니다.

#### 참고 문헌

Ahn YH, Skai A. 1994. Survival by vitrification of *Dendranthema graniflorum* L. shoot tips for cryopreservation. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 35: 499-506.

Engelmann F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In Engelmann F, Takagi H. (eds.) Cryopreservation of Tropical Germplasm - Current Research Progress and Application. JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. pp. 8-20.

Fahy GM, MacFarlane DF, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407-426.

Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology 27: 247-268.

Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. 2004. Improved vitr-

- ification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 48: 22-35.
- Fukai S. 1990. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. *Scientia Horticulturae*, 45: 167-174.
- Halmagyi A, Fischer-Kluver, Mix-Wanger, Schumacher HM. 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema Grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Rep.* 22: 371-375.
- Hirai D, Sakai A. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. In Engelmann F. and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Germplasm - Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. pp. 205-211.
- Hitmi A, Barthelemy C, Sallanon H. 1999. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *CryoLetters* 20: 109-120.
- Kim HH, Cho EG, Baek HJ, Kim CY, Keller ERJ, Engelmann F. 2004. Cryopreservation of garlic meristems by vitrification: effect of dehydration, unloading, rewarming and regrowth conditions. *CryoLetters* 25(1): 59-70.
- Kim HH, Cho EG, Park SU. 2006a. Analysis of factors affecting the cryopreservation of garlic shoot tips. *J. Biomedical Nanotechnology* 2(2): 129-132.
- Kim HH, Lee JK, Yoon JW, Ji JJ, Nam SS, Hwang HS, Cho EG, Engelmann F. 2006b. *CryoLetters* 27: 143-153.
- Martin C, González-Benito E. 2005. Survival and genetic of *Dendranthema grandiflora* Tzelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 51: 281-289.
- 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.
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters* 7: 189-196.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *CryoLetters* 13: 379-388.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 30-33.
- Sakai A, Matsumoto T, Hirai D, Niino T. 2000. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21: 53-62.
- Sakai A, Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28: 151-172.
- Yoon JW, Kim HH, Ko HC, Hwang HS, Hong ES, Cho EG, Engelmann F. 2006. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters* 27: 211-222.