

中国主栽香蕉品种和 INIBAP 引进品种的 SSR 分析研究

宁淑萍^{1,4}, 许林兵², 魏平¹, 葛学军^{3*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640;
3. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用 10 对 SSR 引物对中国 14 个主栽香蕉(*Musa spp.*)品种和从 INIBAP 引进的 33 个香蕉品种进行了遗传多样性分析。10 个多态性位点共揭示出 92 个等位基因, 每个位点的等位基因数从 5 到 15 不等, 平均每个位点的等位基因数是 9.2, 产物片段大小在 75 bp 到 310 bp 之间。用 Jaccard 系数计算品种间的相似性, 相似性数值在 0.1 到 1 之间; 用 UPGMA 进行聚类分析, 结果显示, 14 个主栽品种的遗传变异小, 而供试的 33 个引进品种遗传多样性高。本研究所用的 10 对引物不能把所有的品种区分开。

关键词: 香蕉; 遗传多样性; SSR

中图分类号: Q16

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)01-0016-07

Genetic Diversity of Chinese Main Banana Cultivars (*Musa spp.*) and Introduced Accessions from INIBAP Using Simple Sequence Repeats (SSRs)

NING Shu-ping^{1,4}, XU Lin-bing², WEI Ping¹, GE Xue-jun^{3*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Fruit Tree Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. School of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 4. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Microsatellites were used to investigate the genetic diversity and relationships among 14 Chinese main banana cultivars (*Musa spp.*) and 33 introduced accessions from International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Ten out of forty-seven microsatellite primer pairs amplified reproducible and discrete DNA bands, revealing a total of 92 alleles. The average number of alleles amplified by per primer was 9.2, ranging from 5 to 15. The sizes of PCR products were between 75 bp and 310 bp. The genetic similarity among the cultivars was estimated by the Jaccard coefficient, and the similarity value was between 0.1 and 1. Relationships among the cultivars were evaluated using the unweighted pair-grouping with arithmetic average (UPGMA) clustering. The dendrogram showed that the introduced accessions presented higher levels of genetic diversity than the main cultivars. All the cultivars tested could not be discriminated by the 10 primers.

Key words: Banana; Genetic diversity; SSR

香蕉(*Musa spp.*)属芭蕉科(Musaceae)芭蕉属(*Musa*), 起源于东南亚和西太平洋地区, 后被引入世

界各地^[1]。香蕉是世界上最大宗的热带水果, 是非洲、大洋洲、中美洲部分贫穷国家的主要粮食^[2], 被

收稿日期: 2006-07-05 接受日期: 2006-09-16

* 通讯作者 Corresponding author

联合国粮农组织确定为世界第四大粮食作物^[1]。在我国香蕉是位于苹果、柑橘和梨之后的第四大水果^[2]。我国是香蕉的原产地之一,种质资源丰富,品种繁多,主要栽培品种有香牙蕉型(AAA, Cavendish)、粉蕉(ABB, Fenjiao)、大蕉(ABB, Dajiao)、龙牙蕉(ABB, Longyajiao)、贡蕉(AA, Gongjiao)等^[2]。近年来我国先后引进不少国外品种作为主栽品种,并建立了国家香蕉种质资源圃(广东省农业科学院果树研究所国家种质香蕉圃),收集了香蕉种质 210 多份^[3],其中有国内品种,也有从国际香蕉改良网络(INIBAP)引进的国外品种。然而国内对香蕉种质资源方面的研究十分薄弱,这不仅影响了香蕉种质资源的合理利用,也影响了香蕉的品种改良和育种^[4]。当前,国内香蕉生产的当家品种,大多是引进的巴西、威廉斯 Cavendish 系列品种,品种趋同性高,后备替换品种缺乏,对国内的特有品种和引进的主栽品种都缺乏育种上的创新^[5]。20 世纪 80 年代中期,黑叶斑病(Black Sigatoka)在非洲和拉丁美洲对香蕉造成了毁灭性的灾害,终其原因是香蕉栽培品种遗传多样性低,缺乏抗逆性强的品种。而且近年来香蕉的病虫害日趋严重^[6],因此加强从分子水平研究种质资源间的亲缘关系,建立一套简捷而准确的种质鉴定方法体系,为香蕉新品种的培育和性状改良奠定基础。

香蕉传统的分类方法是 Simmonds^[7]分类法,主要是依据形态学特征进行分类,对于染色体(基因型)的来源是假设的^[7],而且形态特征会受植株年龄、发育时期和环境因素的影响^[8]。应用分子标记进行分类,可以直接作用于相对稳定的遗传物质,避免了植株年龄、发育时期和环境等外界因素的影响。目前研究中多采用分子生物技术手段来减少传统分类上的一些人为因素,弥补形态描述上的不足,所用到的技术有同功酶、叶绿体 DNA 多态性、RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等^[8-14]。

SSR(Simple sequence repeat)又叫微卫星 DNA (Microsatellite DNA),是短的、串联的简单重复序列,它的组成基元是 1-6 个核苷酸,广泛存在于真核细胞的基因组^[15]。根据重复序列两端的特定序列设计引物对重复序列进行 PCR 扩增,不同基因型的多态性表现在序列重复的次数上^[16]。SSR 分子标记具有共显性、高度可重复性、高度丰富的多态性等优点,是构建遗传连锁图谱、研究群体遗传学、进行

分子标记辅助育种、系谱分析和品种鉴定的理想方法^[17]。目前,SSR 标记已经广泛应用于许多植物种群遗传多样性分析,如大麦(*Hordeum vulgare*)、玉米(*Zea mays*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)等^[18]。国际上对香蕉遗传多样性方面的研究也越来越多地应用 SSR 技术^[16,19-20],但与其它物种相比是远远不够的,国内在这方面的研究更是薄弱,易干军等^[5]初步从分子水平上研究了一些香蕉品种的亲缘关系、系统发育和分类,但仍需要开展更深入、更大范围的研究工作。本研究以 INIBAP 引进的品种作对照,通过 SSR 分子标记对国内主栽的一些香蕉品种进行遗传多样性分析,并通过两者之间遗传多样性的比较为今后更大范围的遗传评估和品种鉴定做准备,为新品种的培育和性状改良提供遗传依据。

1 材料和方法

植物材料 采自广东省农业科学院果树研究所国家种质香蕉圃。所选的 14 个主栽品种占国内香蕉种植面积的 60%以上^[2],33 个引进品种是近年来国家种质香蕉圃从 INIBAP 引进的国外品种。选取健壮、无病虫害的植株幼叶,每份样品用保鲜袋包装,采后立即带回实验室,用液氮处理后置于 -80°C 冰箱待用。供试材料见表 1。

DNA 提取 采用 CTAB 法^[21]从新鲜叶片中提取总 DNA,使用 1%琼脂糖凝胶对 DNA 进行检测。

引物 从 Lagoda 等^[19]所用的 47 对引物中筛选出有多态性并且重复性好的引物,最后选出 10 对。引物序列见表 2。

PCR 扩增和检测 20 μ l 反应体系中含基因组 DNA 30 ng, 10 \times buffer 2 μ l (含 $MgCl_2$), 引物 0.2 μ l (10 mmol/L), dNTP 1 μ l (2 mmol/L), *Taq* 酶 0.5 μ l (2 U μ l⁻¹)。SSR 反应程序为: 94°C 变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 退火 45 s (温度依引物定, 见表 2), 72°C 延伸 15 s, 30 个循环; 72°C 最终延伸 5 min。

扩增产物在 6%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,用银染检测。

数据统计与分析 每个等位基因上的多态位点有无分别用 1 和 0 表示,数据分析采用

NTSYS-PC 2.1 软件进行,使用 Jaccard 系数进行相似性分析,使用 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 扩增结果

从 47 对引物中选出 10 对能产生多态性条带而且重复性好的引物,对供试样品进行 SSR 分析。在 10 个多态性位点上,共产生 92 个等位基因,每个位点得到的等位基因数从 5 到 15 不等,平均每个位点的等位基因数是 9.2,产物片段大小在 75 bp 到 310 bp 之间。引物 24 产生的等位基因最多,共 15 个;引物 36 产生的等位基因最少,共 5 个。数据统计时只记录清晰的主带;个别个体未扩增出条带,数据统计时记为缺失。实验中尽管每个位点产生的条带各不相同,但没有发现专属于某个品种的特有带,所以只通过一对引物不能区分其中的任何一个品种,但采用两对或更多引物就能实现对一些

品种的鉴定。

2.2 聚类结果

用 Jaccard 系数计算的相似性系数在 0.1 到 1 之间,图 1 所示为采用 UPGMA 生成的聚类图,图 1A、B、C 分别是 14 个主栽品种、33 个引进品种及全部供试品种的聚类图。图 1A 显示,全部的香牙蕉品种完全相似;红-1、林海红和汕红这 3 个红蕉品种相似性也很高,其中汕红与其它两个品种的亲缘关系稍远一些;这几个香牙蕉和红蕉品种的基因型均为 AAA 型,聚类图上它们的关系也最近,基因型不同的粉蕉和贡蕉与它们的关系较远,关系最远的是龙矮粉。

用 INIBAP 引进品种生成的聚类图 1B,总体而言,树图由两枝组成,品种 IN16、IN32 和 IN33 聚成一小枝与由其他 30 个品种所组成的一大枝汇合。从图中可看出,供试的不同品种间亲缘关系远近各不相同,其中品种 IN14、IN23 和 IN18 的相似性是

表 1 供试材料编号、名称和基因型

Table 1 List of banana varieties used for SSR analysis

编号 Sample No.	品种 Cultivars	基因型 Genotype	编号 Sample No.	品种 Cultivars	基因型 Genotype
1	广西矮 Guangxiai	AAA	IN10	FHIA-23	AAAA
2	河口矮 Hekoai	AAA	IN11	FHIA-25	AAAA
3	红-1 Hong 1	AAA	IN12	SH3436-9	AAAA
4	林海红 Linhaihong	AAA	IN13	SH3640	AAAB
5	汕红 Shanhong	AAA	IN14	GCTCV-119	AAA
6	广东2号 Guangdong 2	AAA	IN15	KM5	AAA
7	贡蕉 Gongjiao	AA	IN16	P.Ceylan	AAB
8	龙矮粉 Long'aifen	ABB	IN17	Gros Michel	AAA
9	巴西蕉 Baxijiao	AAA	IN18	Williams	AAA
10	东莞中把 Dongguanzhongba	AAA	IN19	cvRose	AA
11	高脚 Gaojiao	AAA	IN20	Cachaco	ABB
12	漳蕉8号 Zhangjiao 8	AAA	IN21	Buya	AA
13	福粉 Fufen	ABB	IN22	GCTCV-106	AAA
14	威廉斯 Weiliansi	AAA	IN23	GCTCV-247	AAA
			IN24	Ney pooven	AB
IN1	Bitá-2	ABBB	IN26	Rubusta	AAA
IN2	Bitá-3	AABB	IN27	Pome	AAB
IN3	CRBP39	AAAB	IN28	Veinte Cohol	AA
IN4	FHIA-01	AAAB	IN29	Tumbaga	AA
IN5	FHIA-02	AAAB	IN30	Pamotion	AA
IN6	FHIA-03	AABB	IN31	Morong Princeasa	AA
IN7	FHIA-18	AAAB	IN32	Roiwi	AAB
IN8	FHIA-17	AAAB	IN33	Senorita	AA
IN9	FHIA-21	AAAB	IN37	N-2	AAA

IN表示从 INIBAP 引进的品种。IN indicates the introduced accessions.

表 2 所选用 10 对 SSR 引物的序列、预期片段大小、等位基因数目和退火温度

Table 2 Data on 10 SSR primer sequences, expected sizes (bp) of products, allele number and annealing temperature

引物 Primer	序列 Sequence	预期片段大小 Expected size of products (bp)	等位基因数 Allele number	退火温度 (°C) Annealing temperature
03a	TGACCCACGAGAAAAGAAGC			
03b	CTCCTCCATAGCCTGACTGC	106	9	60
05a	GAAGATTAAGGTGGTGGCTGGAA			
05b	AAGAAATACCAACACAACCACAC	210	10	60
13a	TCCCAACCCCTGCAACCACT			
13b	ATGACCTGTCGAACATCCTTT	267	10	55
14a	CTATTCACAACAAAATTTCTTTTCCT			
14b	TAAAAAATGTTCAAGTATCCTGAG	198	8	55
16a	AATTGAATTTTAGGTGCCCTACTG			
16b	AACATGGAGTGAAGATGAGACGATT	210	10	55
20a	CAGTTTGGCCGCTTGATCTT			
20b	GGGGTCAACATGTTAAGTTCT	333	10	51
21a	TTCATAATTGCAAGAAAGATAA			
21b	GGAGGTACAGGGGATGAGGACT	302	9	55
24a	GGAGGCCCAACATAGGAAGAGGAAT			
24b	CATAAACGACAGTAGAAATAGCAAC	221	15	55
25a	ATCTTTTCTTATCCTTCTAACG			
25b	ATTAGATCACCGAAGAACTC	218	6	55
36a	GATAGATAGAGAAAGAAAGAGGA			
36b	TGTAAGTGAGTCGGCAGGGATGG	223	5	55

100%, 用本实验的 10 对引物不能区分这 3 个品种。引进的品种有二倍体、三倍体和四倍体, 在聚类图上有些关系较近的品种倍性并不相同, 如品种 IN20 和 IN28 相似性高达 73%, 但 IN20 是三倍体, 而 IN28 是二倍体; 再如 IN3 和 IN27, 前者是四倍体而后者是三倍体。这种情况在供试的二倍体品种中尤为明显, 大多二倍体是间插性地出现在三倍体和四倍体中间。

图 1C 综合了实验中所用的全部品种, 结果显示主栽品种虽然都被包含在引进品种的树图中, 但形成的依然是相对独立的分枝, 除了香牙蕉的品种与具有相同基因型的 3 个 AAA 品种完全相似, 其它几个主栽品种与引进品种的遗传相似性低, 虽然同属于 AA 型的贡蕉和 Senorita 被聚在一起, 但二者的相似性系数也仅有 0.52。

3 讨论

3.1 引物特异性

所合成的 47 对引物虽然是 Lagoda 等^[9]于 1998 年从香蕉中开发的, 但应用到本实验的材料中并非都能扩增出清晰的条带, 因此我们只选取了其

中能扩增出效果理想、具有多态性片断的 10 对引物; 而且所用的一些引物在少数品种中不能扩增出条带, 可见香蕉 SSR 引物具有很强的特异性, 与供试品种有很大的关系。这可能是由于不同香蕉品种微卫星位点的侧翼序列不同, 导致片段不能扩增。实验中一些三倍体和四倍体基因型扩增出比预期多的条带, 说明在基因组中极有可能发生了等位基因复制或染色体片断复制^[9]。

3.2 主栽品种和引进品种的遗传多样性

目前香牙蕉型品种(AAA)占我国香蕉栽培总面积的 88%以上。本实验选用了其中的 8 个品种, 聚类图显示它们在遗传上几乎没有差异。香蕉育种通常是对生产过程中出现的优良突变体进行选择, 而现在的育种工作主要集中在 AAA 型品种的诱导突变、辐射突变、体细胞杂交等, 因此在遗传上很难有大的突破, 要想增加香蕉品种的遗传多样性, 就应该选择不同基因型的品种作亲本。实验结果表明, 国家香蕉种质资源圃中从 INIBAP 引进品种的遗传多样性丰富, 这些品种来自不同的国家或地区, 地理距离可能是导致其遗传差异的一个重要因素。但有些品种, 如 GCTCV-119, GCTCV-247, Williams

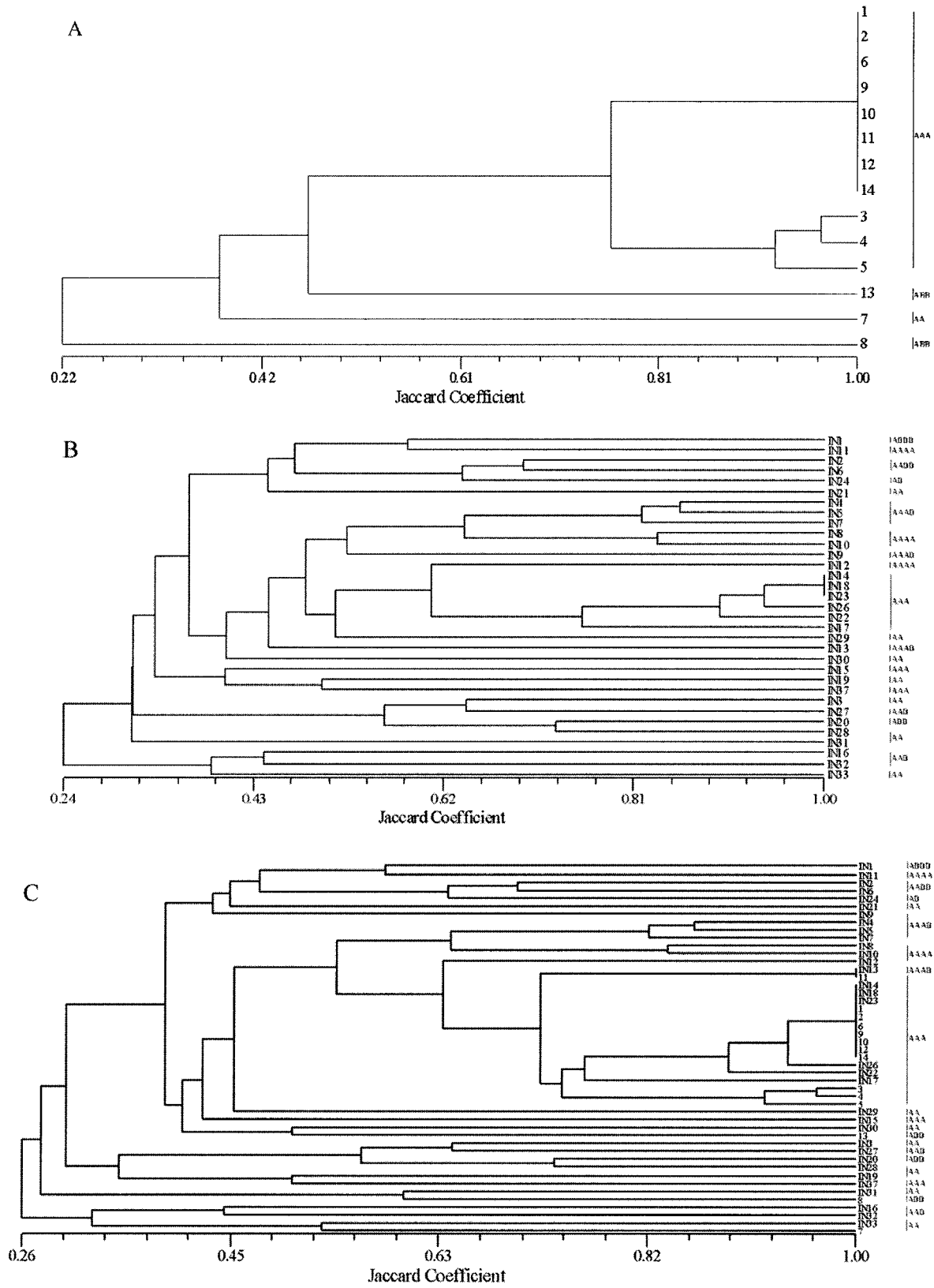


图 1 基于 Jaccard 系数的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 Dendrogram generated by UPGMA showing the relationships among the banana cultivars based on the Jaccard coefficient
A: 中国主栽品种 Chinese main cultivars; B: INIBAP 引进品种 Cultivars from INIBAP; C: 所有供试品种 All cultivars tested.

分别来自台湾和澳大利亚,虽然来源地不同,亲缘关系却很近,甚至完全一致,这些品种是否具有相同起源有待进一步研究。引进品种和主栽品种,除了几个 AAA 型的品种遗传上极为相似外,其余的遗传差异很大,在今后的育种工作中可以选择那些差异明显的引进品种作为亲本来丰富香蕉品种的遗传多样性。我们应充分利用引进的香蕉种质资源,同时要进一步加强国际间的交流,使国内的主栽品种不断得到丰富和改善,增加主栽品种的后备力量。

在图 1B 和 C 中可以看出,二倍体 AA 型的品种分散在全部的供试品种中,彼此之间的差异较大,这可能与它的起源有一定的关系。由于 AA 型香蕉与野生种小果野蕉(*M. acuminata*; AA)基因型相同,因此,它可能是由小果野蕉直接突变而来或由小果野蕉种内亲缘关系较远的两个亚种杂交产生的不育系,再通过人工选育而来的。小果野蕉种内变异很大^[13],同时,AA 型香蕉有很多地方栽培品种,因此来源不同的 AA 型香蕉品种变异很大,这些遗传变异丰富的 AA 型栽培品种可以作为育种的基础。含 B 基因的品种在树图上没有明显的规律,虽然部分品种能聚在一起形成很小的分枝,但整体而言是分散的。它们彼此之间的相似性较低,在本实验中未能形成一个完全区别于含 A 基因品种的特征。野生芭蕉(*M. balbisiana*, BB)比含 A 基因的香蕉更能抗病害和干旱^[22],因此在育种上含 B 基因的品种具有某一特性的选择优势,应加强对此类品种的研究。

3.3 分子标记与形态描述互为补充

实验发现,微卫星标记的有些结果与形态描述不一致。如 IN14 在形态上与 IN23 和 IN18 有很大不同,IN23 和 IN18 形态上相近,而微卫星标记显示这 3 个品种完全一致。可能的原因有:一、形态上的突变容易发生,而遗传上的变异需要更长时间的积累。来源相同的品种 SSR 条带相同,说明在植物繁殖中等位基因的组成没变;二、实验所检测的位点太少,基因上有差异的片段没有被检测到。应用更多的特异引物或许能检测到片段的差异。

SSR 可以估计二倍体物种不同基因型间等位基因的关系,但对于香蕉这样的多倍体物种,实验中所获得的条带类型就不能用于确定基因型间等位

基因的关系。多倍体中的微卫星多态,每个等位基因被作为一个独立的特征加以解释而没有考虑到基因含量的影响^[16],品种间的亲缘关系主要是和基因组组成有关。如本实验中 IN2 和 IN6 是 AABB 型,而 IN24 是 AB 型,三者的亲缘关系就很近;另外,IN3 是 AAAB 型,而 IN27 是 AAB 型,两个品种的相似性也很高。由此可见,在香蕉品种的分类和鉴定上分子标记和形态描述要互为补充。

随着分子生物学技术的不断发展,新的方法和技术不断涌现,SSR 分子标记作为一种新兴的技术,比等位酶、RAPD、RFLP 等方法能产生更高的多态性,遗传分析更准确;AFLP 现在应用也很广泛,一对引物能扩增出几十甚至上百条带,对遗传差异的检测更灵敏,但 SSR 较之更稳定,不会产生太多非特异性的条带。近年来 SSR 凭借它所具有的多种优点被广泛地应用到遗传多样性方面的研究,国内外也已有大量关于作物野生种、栽培种以及二者之间遗传关系评价的报道,但由于栽培作物通常具有大量的品种,目前使用少量的 SSR 引物实现对栽培品种的鉴定还比较困难。

致谢 广东省农业科学院果树研究所国家果树种质广州香蕉圃提供试验材料,特此致谢!

参考文献

- [1] Simmonds N W. The Evolution of the Bananas. Tropical Science Series [M]. London: Longmans, 1962. 1-12, 170.
- [2] Wan L B(万连步), Yang L(杨力), Zhang M(张民). Banana [M]. Shandong: Shandong Science and Technology Press, 2004. 1-4. (in Chinese)
- [3] Moffat A S. Crop engineering goes South [J]. Science, 1999, 285: 370-371.
- [4] 汪用文. 国家种质资源圃保存资源名录 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005. 603-610.
- [5] Yi G J(易干军), Yu X Y(于晓英), Huo H Q(霍合强), et al. Making template DNA in the study of identification and classification of banana germplasm based on AFLP fingerprint [J]. J Fruit Sci (果树学报), 2001, 18(6):345-348. (in Chinese)
- [6] Yang P S(杨培生), Chen Y Y(陈亚渊), Li G H(黎光华), et al. Analysis on the development of banana industry in China [J]. J Fruit Sci (果树学报), 2003, 20(5):415-420. (in Chinese)
- [7] Yi G J(易干军), Yu X Y(于晓英), Huo H Q(霍合强), et al. Studies on the certification of *Musa* ABB group Dajiao, *M. AAB* group Fenjiao and *M. AAB* group Longyajiao by AFLP [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2002, 29(5):413-417. (in Chinese)
- [8] Bhat K V, Jarret R L, Rana R S. DNA profiling of banana and

- plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers [J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(9):1736–1745.
- [9] Bhat K V, Bhat S R, Chandel K P S. Survey of isozyme polymorphisms for clonal identification in *Musa* [J]. *J Hort Sci*, 1992, 67(6):501–507.
- [10] Carreel F, Gonzalez de Leon D, Lagoda P, et al. Ascertaining maternal and paternal lineage within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analyses [J]. *Genome*, 2002, 45(4):679–692.
- [11] Ge X J, Liu M H, Wang W K, et al. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(4):933–944.
- [12] Onguso J M, Kahangi E M, Ndiritu D W, et al. Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers [J]. *Sci Hort*, 2004, 99(1):9–20.
- [13] Wong C, Kiew R, Loh J P, et al. Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP [J]. *Ann Bot*, 2001, 88(6):1017–1025.
- [14] Creste S, Tulmann-Neto A, Vencovsky R, et al. Genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2004, 51:723–733.
- [15] Zou Y P(邹喻莘), Ge S(葛颂), Wang X D(王晓东). *Molecular Marker in Systematic and Evolutionary Botany* [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [16] Creste S, Tulmann-Neto A, Sebastião O, et al. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers [J]. *Euphytica*, 2003, 132(3):259–268.
- [17] Li M F(李明芳), Zheng X Q(郑学勤). Research progress of methods of SSR primers development [J]. *Hereditas(遗传)*, 2004, 26(5):769–776. (in Chinese)
- [18] 张志敏,熊国梅,王慧娟. 简单重复序列的筛选与应用 [J]. *生命的化学*, 2004, 24(3):254–257.
- [19] Lagoda P J, Noyer J L, Dambier D, et al. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7:657–666.
- [20] Grapin A, Noyer J L, Carree F, et al. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19:1374–1380.
- [21] Doyle J. DNA protocols for plants — CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt G M, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Berlin: Springer, 1991. 283–293.
- [22] Sotto R C, Rabara R C. Morphological diversity of *Musa balbisiana* Colla in the Philippines [J]. *InfoMusa*, 2000, 9(2):28–30.