DBXX

陕 西 省 市 地 方 标 准

DBXX/TXXX-20xx

猕猴桃无病毒种苗生产技术规程

Technical code for the production of virus-free kiwifruit stock

**（征求意见稿）**

20xx-xx-xx发布 20xx- xx-xx实施

陕西省市场监督管理局 发布

**前 言**

本标准依据GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》起草。

本标准由陕西省农业农村厅提出并归口。

本标准起草单位：西北农林科技大学、杨凌梦绿生态农业有限责任公司。

本规程起草人：刘占德，张阿玲，史遐，刘艳飞，贺浩浩，高志雄。

本标准为首次发布。

1 适用范围

本标准规定了猕猴桃病毒脱除方法、病毒检测方法、脱毒种苗保存与繁殖。

本标准适用于猕猴桃脱毒种苗繁育及猕猴桃病毒检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 茎尖培养脱毒Virus elimination by shoot tip culture

切取0.2~0.5 mm带毒试管苗茎尖，经组织培养获得无病毒植株的过程。

2.2 茎尖超低温疗法脱毒 Virus elimination by shoot tip cryotherapy

切取1.0~2.0 mm带毒试管苗茎尖，经液氮处理后进行组织培养获得无病毒植株的过程。

2.3 热疗法结合茎尖培养脱毒 Virus elimination by thermotherapy combined with shoot tip culture

先对带毒试管苗进行热处理，热处理结束后取茎尖进行茎尖培养获得无病毒植株的过程。

2.4 化疗法结合茎尖培养脱毒 Virus elimination by chemotherapy combined with shoot tip culture

先将带毒试管苗置于含抗病毒药物的培养基中培养，培养结束后取茎尖进行茎尖培养获得无病毒植株的过程。

2.5 热疗法结合茎尖超低温疗法脱毒 Virus elimination by thermotherapy combined with shoot tip cryotherapy

先对带毒试管苗进行热处理，热处理结束后取茎尖进行超低温处理，最后经组织培养获得无病毒植株的过程。

2.6 化疗法结合茎尖超低温疗法脱毒 Virus elimination by chemotherapy combined with shoot tip cryotherapy

先将带毒试管苗置于含抗病毒药物的培养基中培养，培养结束后取茎尖进行超低温处理，最后经组织培养获得无病毒植株的过程。

2.7 化疗法结合热疗法和茎尖培养脱毒 Virus elimination by chemotherapy combined with thermotherapy and shoot tip culture

先将带毒试管苗置于含抗病毒药物的培养基中培养，之后进行热处理，热处理结束后取茎尖进行组织培养获得无病毒植株的过程。

2.8 热疗法结合化疗法和茎尖超低温疗法脱毒 Virus elimination by thermotherapy combined with chemotherapy and shoot tip cryotherapy

先将带毒试管苗置于含抗病毒药物的培养基中培养，之后进行热处理，热处理结束后再取茎尖进行超低温处理，最后经组织培养获得无病毒植株的过程。

2.9 无病毒母株 virus-free mother plant

通过病毒脱除处理或直接筛选获得的、经检测并确认不携带本文件规定的病毒的植株。

2.10 无病毒苗木 virus-free seedling

未携带有本文件规定的病毒的猕猴桃苗木。

2.11 无病毒母本园 virus-free mother block

用于提供猕猴桃无病毒母株保存的圃地。

3 脱毒原理

病毒在植物体内分布不均匀，植物茎尖顶端分生组织中的病毒含量较低甚至不含病毒，热处理及抗病毒药物处理能够抑制病毒RNA的合成，因此可通过茎尖培养，或结合热疗及化疗对植物病毒进行脱除；在茎尖超低温疗法脱除植物病毒中，茎尖经过冷冻保护处理后转入液氮中冷冻时，分化程度较低、核质比大、自由水含量较低的茎尖顶端分生组织和幼嫩叶原基细胞更容易存活。由于很多病毒无法侵入茎尖顶端分生组织，因此无病毒的顶端分生组织可以在液氮冷冻后存活并再生为无病毒植株。

4 病毒检测与脱除

4.1 病毒种类

病毒种类见表A.1。包括猕猴桃病毒A（*Actinidia* virus A，AcVA）、猕猴桃病毒B（*Actinidia* virus B，AcVB）、猕猴桃种传潜隐病毒（*Actinidia* seedborne latent virus，ASbLV）、猕猴桃黄化环斑病毒（*Actinidia* yellowing ringspot virus，AYRSpV）、猕猴桃病毒 1（*Actinidia* virus 1，AcV-1）、猕猴桃黄化病毒1（*Actinidia* yellowing virus 1，AcYV1）、猕猴桃黄化病毒 2（*Actinidia* yellowing virus 2，AcYV2）、苹果茎沟病毒（Apple stem grooving virus，ASGV）、樱桃卷叶病毒（Cherry Leaf Roll virus，CLRV）、天竺葵带斑病毒（Pelargonium zonate spot virus，PZSV）、柑橘叶斑驳病毒（Citrus leaf blotch virus，CLBV）等。

4.2 病毒检测

采用RT-PCR的方法进行病毒检测。具体参见附录A。

4.3 猕猴桃无病毒母株的获取

4.3.1 材料选择

选择品种纯正、经观察未发现病毒病症状且生长健壮、性状优良的植株，参照4.2的方法进行病毒检测，确定不携带4.1规定的病毒的可作为无病毒母株；经检测，确定植株已感染4.1规定的病毒，则应进行脱毒处理，病毒脱除后培育的猕猴桃植株，经检测为无病毒的，也可作为无病毒母株。

4.3.2 外植体的建立

选取健壮猕猴桃植株当年生新梢作为外植体，剪去叶片，用自来水和洗洁精溶液充分清洗干净。将枝条剪成长3~5 cm的茎段，于超净台内用75 %酒精表面消毒10~30 s，再用1 %的次氯酸钠溶液消毒5~10 min，最后用无菌水冲洗4~5次。将消毒后的外植体切成长1.5 cm的带芽茎段，用无菌滤纸吸干其表面的水分后，接种至初分化培养基中，诱导茎段腋芽萌发。4周后萌发的腋芽切下，置于增殖培养基中进行继代培养，每4~6周继代一次。培养温度24℃ ± 2℃，光照强度3000 lx，光照时间16 h/d。

4.3.3 病毒的脱除

4.3.3.1 茎尖培养脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，于超净工作台中在体式显微镜下切取0.2~0.5 mm的茎尖，将其转接至含增殖培养基的培养皿中培养，每4周继代一次。当茎尖长成小植株时转至含增殖培养基的组培瓶中继续培养。

4.3.3.2茎尖超低温疗法脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，于超净工作台中在体式显微镜下切取1.0~2.0 mm的茎尖。先将茎尖置于0.25 M蔗糖溶液中预培养24 h；后转置于0.5 M蔗糖溶液中预培养24 h；预培养结束后，将茎尖转置于加载液中室温下处理20 min；加载完成后，将茎尖转置于提前预冷的玻璃化冷冻保护液PVS2中冰上处理20~60 min。PVS2处理结束前两分钟，将茎尖转移至灭菌铝箔条上的PVS2液滴中，后将铝箔条置于液氮中处理1 h。液氮处理完毕后将带有茎尖的铝箔条从液氮中取出，迅速放入卸载液中解冻20 min；卸载完成后，将茎尖转置至恢复培养基中，先于24 ± 2 ℃的温度条件下黑暗培养3 d，后转入正常光照下培养，每4周继代一次。茎尖超低温疗法脱除猕猴桃病毒所用溶液配方参见附录B，脱毒流程参见附录C。

4.3.3.3 热疗法结合茎尖培养脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，切取约2 cm大小的茎段先于正常条件下培2周，后转至热处理箱（温度：30 ℃~40 ℃；光照强度：3000 lx；光照时间：16 h/d）。热处理的方式主要有三种：对于耐热品种，可采用恒温处理；中等耐热品种及热敏感品种则可采用变温处理或逐步升温处理。处理时间为2~4周。热处理结束后切取0.2~0.5 mm茎尖进行茎尖培养，方法同4.3.3.1。

4.3.3.4 化疗法结合茎尖培养脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，取约2 cm大小的茎段置于含15~100 mg/L利巴韦林的培养基中培养4~6周，后取0.2~0.5 mm茎尖进行茎尖培养，方法同4.3.3.1。

4.3.3.5 热疗法结合茎尖超低温疗法脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，取约2 cm大小的茎段先进行热处理，方法同4.3.3.3。热疗结束后切取1.0~2.0 mm大小的茎尖进行超低温处理，方法同4.3.3.2。

4.3.3.6 化疗法结合茎尖超低温疗法脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，切取约2 cm大小的茎段进行化疗，方法同4.3.3.4。化疗结束后切取1.0~2.0 mm大小的茎尖进行超低温处理，方法同4.3.3.2。

4.3.3.7 化疗法结合热疗法和茎尖培养脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，切取约2 cm大小的茎段接种至含15~100 mg/L利巴韦林的培养基中先于正常条件下培养2周，之后将其转至热处理箱继续培养2~4周，热疗和化疗方法同4.3.3.3和4.3.3.4。热疗和化疗结束后取0.2~0.5 mm茎尖进行茎尖培养，方法同4.3.3.1。

4.3.3.8 热疗法结合化疗法和茎尖超低温疗法脱毒

以4~6周苗龄的猕猴桃带毒试管苗为材料，取约2 cm大小的茎段先进行热疗和化疗，方法同4.3.3.7。热疗和化疗结束后取1.0~2.0 mm大小的茎尖进行超低温处理，方法同4.3.3.2。

4.4 病毒脱除后茎尖再生与病毒检测

经脱毒处理的茎尖培养2个月后，出现明显的茎段伸长（≥ 5 mm）并再生出2~3片新叶时视为再生，随后将再生茎尖转接到增殖培养基上继续培养。大约培养1个月后，脱毒处理再生苗出现分株，此时将来源于同一个茎尖的植株转至同一个组培瓶中并编号，继代培养4~6周后取样进行第一次病毒检测。将检测结果为阴性的植株继续继代培养4~6周后取样进行第二次病毒检测，将两次检测结果均为阴性的试管苗初步定为脱毒苗。此后，每4~6周继代一次脱毒苗。

4.5 生根培养

以不带病毒的增殖苗为材料，切取约2 cm大小的茎段转接到生根培养基（1/2 MS + 0.6 mg/L IBA，pH=5.8），在24 ± 2 ℃条件下，进行4周左右的生根培养。

4.6 炼苗和移栽

从生根培养至幼根长至1 cm 左右时，将组培瓶移入日光温室炼苗，遮阴3 d不开瓶口，拧松瓶口放置1 d，将瓶口敞开2 d，之后进行移栽，控制气温不超过30 ℃，空气相对湿度在90 %以上。

将经过炼苗的组培苗洗净培养基，移栽至基质为珍珠岩：泥炭：细沙=1:1:1或发酵饼肥：土壤：基质1:1:1并用多菌灵消毒晾干后的营养钵（口径 × 高为16 cm × 16 cm），浇透水，置于覆盖60目防虫网的温网室内，在营养钵上覆盖塑料薄膜，期间及时喷水以保持茎叶湿润，15 d后揭去薄膜。

4.7 无病毒苗移栽后病毒复检

脱毒苗移栽半年后进行病毒复检，若复检结果为阴性，则可认定为脱毒苗；若复检结果为阳性，则该再生苗不是脱毒苗，需进行进一步的脱毒处理。此后每年至少做一次病毒复检，以防病毒再次感染。

5 无病毒母本园的建立

5.1 圃地准备

圃地所在区域应为非猕猴桃溃疡病发生区与猕猴桃适栽区。选择疏松肥沃、排水良好、微酸性的砂质壤土，且5年内未栽植过果树的地块。

5.2 无病毒母株的栽植

经检测确定不携带4.1规定的猕猴桃病毒，或经4.3猕猴桃病毒脱除的植株可作为无病毒母株按株行距为3 m × 4 m定植在网室中。调查、分析并记录每单株的园艺学性状，待显示固有的园艺学性状后，选做母本树，提供无病毒接穗。

5.3 无病毒母本园的管理

无病毒母本园常用工具须专用，枝剪、刀、锯子等在操作每个植株之前均需用75 %的酒精消毒。此外，工作人员进出园圃也应消毒，并严格执行其他人员进出登记、安全检疫制度。

每月定期观察圃内猕猴桃无病毒母株是否有病毒病症状，每年春梢萌发后10 d进行病毒检测，经检测，淘汰不符合2.10定义的植株。

6 无病毒苗木的繁育

6.1 苗圃准备

选择疏松肥沃、排灌水方便、光照良好、冬春季无霜冻的地块作为苗圃地；冬春季有霜冻的区域，在温室大棚建立苗圃。

6.2 砧木准备

选择生长健康、无病虫害的，参照4.2的方法检测后不携带病毒或脱毒后茎粗达0.6 cm以上的猕猴桃砧木苗，嫁接前砧木苗摘心，并去除基部萌蘖。

6.3 接穗采集

取生长健壮、芽体饱满、无病害的当年生木质化的猕猴桃无病毒母株枝条，挂牌标记母株编号。冬季剪下的接穗，应立即放在阴凉处，用2 %湿沙埋藏备用。

6.4 嫁接

春、夏嫁接多采用单芽枝接，也可采用单芽枝腹接法或带木质芽接。

6.5 嫁接后管理

6.5.1 剪砧及抹除砧蘖

嫁接后砧木接口下萌发的不定芽及时剪除。接芽失败或风折不能再萌发的，应在砧木是选留一个枝条，以备后期补接。采用单芽枝腹接法或带木质部芽接法的嫁接苗成活后应立即剪砧，剪口离接芽3~4 cm，砧木上萌蘖应及时抹除。。

6.5.2 解绑

接穗嫁接部位完全愈合，新梢半木质化以后及时解去嫁接时的绑扎带。为防止风劈促进接口愈合牢固，扎带自上而下分两次解除，每次一半，间隔两周。

**6.5.3 立支柱及摘心**

当接芽长到20cm时，在嫁接苗的旁边插竹竿作立柱，引缚护苗防风劈，绑缚时使用“∞”字形活结。新梢拉直吊端向上生长，不要缠绕生长。

6.5.4 土、水、肥管理

经常保持育苗地土壤湿润，土壤相对湿度在70 %~80 %之间。有积水时要及时排出，及时中耕除草，根据苗木长势进行叶面喷肥或结合中耕除草、浇水等进行追肥，用尿素或磷酸二氢钾进行叶面施肥，浓度不得超过0.3 %，土壤追肥每667 m2每次施入尿素或磷酸二氢钾7.5~10 kg，9月中旬停止施肥，促进苗木木质化。

6.5.5 摘心

在幼苗生长6~8 片叶50~60 cm时，应及时摘心，以促进组织充实苗木粗壮。

7 无病毒苗木出圃

苗木出圃前，定期观察猕猴桃苗木形态特征，剔除有病毒病症状的植株。病毒脱除的猕猴桃苗木出圃前，每批次应进行1次病毒检测，按照GB/T 2828.10规定的方法进行抽检。若检测出携带病毒，应根据标记，追踪其母株并进行病毒检测。若母株也携带病毒，则立即清除该母株及其周边临近的植株；若母树不带病毒，则立即清除携带病毒的苗木及其周边临近植株。无病毒苗木出圃应满足表1所规定的质量要求。

表1 猕猴桃无病毒苗木质量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | | 级别 | | |
| 一级 | 二级 | 三级 |
| 品种与砧木 | | 品种与砧木纯正。实生苗和嫁接苗砧木应以抗性强的美味、对萼、大籽猕猴桃为主。 | | |
| 根 | 侧根形态 | 侧根没有缺失和劈裂伤 | | |
| 侧根分布 | 均匀、舒展而不卷曲 | | |
| 侧根数量（条） | ≥ 4 | | |
| 侧根长度（cm） | 当年生苗≥ 20.0，二年生苗≥ 30.0 | | |
| 侧根粗度（cm） | ≥ 0.5 | ≥ 0.4 | ≥ 0.3 |
| 苗干 | 直曲度（cm） | ≤ 15.0 | | |
| 高度（cm） | ≥ 60 | ≥ 50 | ≥ 40 |
| 粗度（cm） | ≥ 1.0 | ≥ 0.8 | ≥ 0.6 |
| 实生苗，饱满芽数（个） | ≥ 5 | ≥ 4 | ≥ 3 |
| 嫁接苗品种部位，饱满芽数（个） | ≥ 5 | ≥ 4 | ≥ 3 |
| 根皮与茎皮 | | 皮层鲜活有光泽，无干缩皱皮，无新损伤，老损伤处总面积不超过1.0 cm² | | |
| 接合部愈合情况 | | 愈合良好。枝接要求接口部位砧穗粗细一致，没有大脚（砧木粗、接穗细）、小脚（砧木细、接穗粗）或嫁接部位凸起臃肿现象；芽接要求接口愈合完整，没有空、翘现象。 | | |
| 木质化程度 | | 完全木质化 | | |
| 病虫害 | | 无根结线虫、无蚧壳虫、无溃疡病、无疫霉病、无根腐、无飞虱、无螨类等。无国家规定的检疫对象。 | | |
| 病毒检测 | | 不携带4.1规定的病毒种类 | | |

8 无病毒苗木的标识与包装

8.1 标识

猕猴桃无病毒母株标签应包括品种、母株编号、病毒检测单位、母株培育单位等信息。猕猴桃无病毒苗木标签应包括品种、等级、株数、病毒检测单位、生产单位、地址等信息。

8.2 包装

猕猴桃无病毒苗木应按照品种和等级分别包装。包装内外应附有苗木标签。

附录A

（资料性附录）

猕猴桃病毒检测方法（RT-PCR法）

A.1 适用范围

本附录提供的RT-PCR法适用于已知核酸序列的猕猴桃病毒的检测。

A.2 仪器设备

恒温水浴锅；涡旋仪；高速冷冻离心机；-20 ℃冰箱；超微量分光光度计；PCR仪；电泳仪；凝胶成像仪。

A.3 试剂

CTAB裂解液、β-巯基乙醇、液氮、氯仿、异戊醇、氯化锂、无水乙醇、RNase-free 水、反转录试剂盒、PCR扩增试剂盒、核酸染料、TAE缓冲液。

A.4 操作步骤

A.4.1 总RNA提取

（1）于1.5 mL无酶离心管中加入600 μL CTAB裂解液和40 μL β-巯基乙醇，65 ℃预热；

（2）称取0.1 g待检植株叶片样品于液氮中迅速研磨至粉末状，将粉末转至a中的离心管，涡旋混匀30 s，65 ℃ 水浴10 min，期间颠倒混匀2-3次；

（3）加入等体积的氯仿异戊醇混合液（V : V=24:1），颠倒混匀，4 ℃条件下，11000 rpm离心10 min；

（4）取500 μL上清液，加入等体积的氯仿异戊醇混合液（V : V=24:1），颠倒混匀，4℃条件下，11000 rpm离心10 min；

（5）取400 μL上清液，加入二分之一体积的氯化锂溶液（6 M），颠倒混匀，-20 ℃ 沉淀2-3 h；

（6）4 ℃条件下，12000 rpm离心10 min，弃上清；

（7）加入500 μL 75 %乙醇洗涤沉淀，4 ℃条件下，12000 rpm短暂离心30 s，弃上清。

（8）加入500 μL 无水乙醇洗涤沉淀，4 ℃条件下，12000 rpm短暂离心30 s，弃上清并吸除残留液体，后将离心管倒扣晾干5 min。

（9）加入30 μL RNase-free 水溶解沉淀，检测所提取总RNA的浓度、纯度及完整性。若总RNA质量合格，则立即进行cDNA合成或置于-80 ℃超低温冰箱保存备用；若总RNA质量不合格，则需重新提取。

A.4.2 cDNA合成

按照反转录试剂盒说明书进行操作。

A.4.3 PCR扩增

A.4.3.1 PCR反应体系

PCR反应液组成为：12.5 μL 2×Taq Mix，1 μL cDNA模板，上下游引物（10 μM）各1 μL，无菌蒸馏水补足至终体积25 μL。目标病毒对应的特异性检测引物及扩增产物大小见表A.1。

A.4.3.2 PCR反应程序

PCR扩增程序为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，54 ℃退火30 s，72 ℃延伸 15-40 s，循环35次；72 ℃终延伸5 min。

A.4.4 PCR产物检测

制备1 %琼脂糖凝胶，对PCR产物进行电泳检测。电泳结束后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中成像，并拍照记录。

A.4.5 检测结果分析

（1）当检测样品中出现目标条带，阴性对照和空白对照未出现目标条带时，视为阳性，即检测样品中携带相应病毒。

（2）当检测样品中未出现目标条带，阴性对照和空白对照也未出现目标条带时，视为阴性，即检测样品中不携带相应病毒。

（3）当阴性对照或空白对照出现目标条带时，无论检测样品中是否出现目标条带，检测结果均视为无效，应重新检测。

表A.1 猕猴桃病毒检测引物序列及扩增产物大小

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **病毒名称** | **引物序列（5’-3’）** | | **产物大小（bp）** | |
| 猕猴桃病毒A  （AcVA） | | F: CATGGCAAAGAATATCTCAAG | | 471 |
| R: AGATCCAACCCAGAGTTGAAA | |
| 猕猴桃病毒B  （AcVB） | | F: GTTTGCGAGGAGACGTAGGGC | | 342 |
| R: AGTTAAGTGCTCTYGGRGGTGTG | |
| 猕猴桃病毒C  （AcVC） | | F: AAAGAACCCTACCTCCACC | | 1106 |
| R: CCATCTATATCTCAACAGCCTGCTCG | |
| 猕猴桃病毒D  （AcVD） | | F: AGGACACTCAAGCCTCAACATC | | 847 |
| R: TTGTAGGCGACCCACAGAAG | |
| 猕猴桃褪绿环斑病毒（AcCRaV） | | F: ATCCAAGAATTCCTTAACAGCA | | 477 |
| R: TGTGCAATCATGGCTTATCAGA | |
| 猕猴桃黄化病毒1  （AcYV1） | | F: CAACGCCGCAAACATCCTTAT | | 624 |
| R: CACCTGCTTCTCACAAACAGTCTCA | |
| 猕猴桃黄化病毒2  （AcYV2） | | F: AAAACAACTCAACAGAAACGCACTA | | 530 |
| R: TTCCCTGAAGTAGACAGAATAGACG | |
| 猕猴桃黄化环斑病毒（AYRSpV） | | F: TTTGGACTGGGAACGTAGAGG | | 337 |
| R: CGAGAAAGTGAGGTTATCGGG | |
| 猕猴桃种传潜隐病毒（ASbLV） | | F: GCDAARGCNGGNCARACHHTVGCBTGYTT | | 363 |
| R: RAAYTCNCCNSWRAANCKCAT | |
| 猕猴桃病毒1  （AcV-1） | | F: AGGAATATTGGATCGGTTGTCG | | 208 |
| R: GATGGTCAGTCTTAATCTCC | |
| 猕猴桃山梣病毒2  （AcEV-2） | | F: CTGCTATACATCCTGAATGGT | | 985 |
| R: GATGTCTTTGTACTAGATGC | |  |
| 苹果茎沟病毒  （ASGV） | | F: CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC | | 499 |
| R: GGAATTTCACACGACTCCTAACCCTCC | |
| 柑橘叶斑驳病毒  （CLBV） | | F: GAAAAGCAACGAAAGCAACCTA | | 328 |
| R: CGAACAAGATGTGATTCTCG | |
| 樱桃卷叶病毒  （CLRV） | | F: GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG | 416 | |
| R: TGGCGACCGTGTAACGGCA |
| 天竺葵轮斑病毒  （PZSV） | | F: GATAAATTCAGAGCTCTCGG | 997 | |
| R: ATCTCTGCAGATTGTGTTCC |
| 黄瓜花叶病毒  （CMV） | | F: GAGTCGTGCGTTTTCTTTGTGTTTT | 183 | |
| R: AATGGCGAGGGTTTTATTGAGTC |
| 马铃薯X病毒  （PVX） | | F: AGTGCGCGAGGTTTACCAATC | 790 | |
| R: GTGGTTTGCCGCGAACGATTC |
| 番茄坏死斑点相关病毒（TNSaV） | | F: ATGATTTGTTTGGGGTTATG | 350 | |
| R: GAATGGTTCTCCCTCTATGG |

附录B

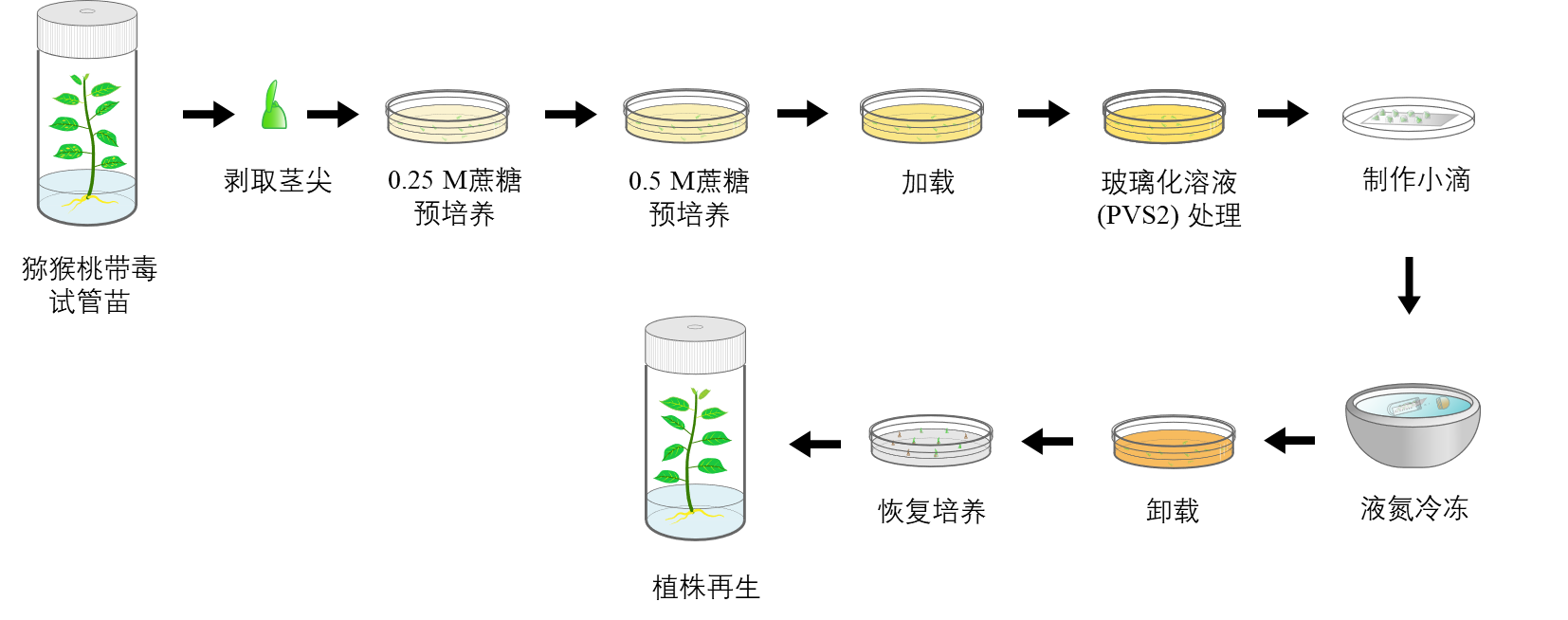
（资料性附录）

表B.1 超低温疗法脱除猕猴桃病毒所用溶液配方

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **溶液名称** | **组分** | | | | |
| **MS** | **蔗糖** | **丙三醇** | **乙二醇** | **二甲基亚砜** |
| 0.25 M蔗糖溶液 | 4.43 g/L | 0.25 M | / | / | / |
| 0.5 M蔗糖溶液 | 4.43 g/L | 0.5 M | / | / | / |
| 加载液 | 4.43 g/L | 0.4 M | 2 M | / | / |
| PVS2 | 4.43 g/L | 0.4 M | 30% (w/v) | 15% (w/v) | 15% (w/v) |
| 卸载液 | 4.43 g/L | 1.2 M | / | / | / |

附录C

（资料性附录）



图C.1茎尖超低温疗法脱除猕猴桃病毒流程图