**ICS 65.020.20**

**CCS B04**

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXX—XXXX

代替NY/T 1690-2009

香蕉种质资源离体保存技术规程

Technical regulation for invitro conservation of banana germplasm

征求意见稿

(本草稿完成时间：2025.10.11)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

|  |  |
| --- | --- |
| 中华人民共和国农业农村部 | 发布 |

# 目  次

目  次 I

前  言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

3.1 外植体explant 1

3.2 继代subculture 1

3.3 无害化（除害）decontamination 1

3.4 繁育breeding 1

3.5 挽救rescue 1

3.6 常温保存normal temperature conservation 1

3.7 低温保存low temperature conservation 1

3.8 超低温保存cryopreservation 1

4 基本要求 2

5 香蕉种质资源离体保存程序 2

6 资源的采集及包装 3

6.1 采集材料类型 3

6.1.2 果实 3

6.1.3 试管苗 3

6.2 资源采集 3

6.2.1 吸芽采集 3

6.2.2 种子采集 3

6.3 资源包装 3

6.3.1 包装材料 3

6.3.2 包装 3

7 无害化（除害） 3

7.1 病虫害类型 3

7.1.1 主要病害 3

7.1.2 主要虫害 3

7.2 不同材料的无害化方法 3

7.2.1 吸芽无害化 4

7.2.1.1 取材方法 4

7.2.1.2 培养条件 4

7.2.1.3 繁育 4

7.2.1.4 生根培养 4

7.2.1.5 残余物的处理 4

7.2.2 种子无害化 4

7.2.2.1 取材方法 4

7.2.2.2 培养方法 4

7.2.2.3 繁育 4

7.2.2.4 生根培养 4

7.2.2.5 残余物的处理 5

8 挽救 5

8.1 材料 5

8.1.1 试管苗 5

8.1.2 吸芽 5

8.2 挽救 5

8.2.1 试管苗挽救 5

8.2.1.1 取材方法 5

8.2.1.2 培养方法 5

8.2.1.3 繁育 5

8.2.1.4 生根培养 5

8.2.2 吸芽挽救 5

8.2.2.1 取材方法 5

8.2.2.2 培养方法 6

8.2.2.3 二次处理方法 6

8.2.2.4 繁育 6

8.2.2.5 生根培养 6

8.2.2.6 残余物的处理 6

9 检测 6

9.1 病毒检测 6

9.1.1 分子检测 6

9.1.1.1 BBTV病毒分子检测 6

9.1.1.2 CMV的RT-PCR扩增 6

9.1.1.3 PCR 产物凝胶电泳检测 7

9.1.1.4 结果判定 7

9.1.2 ELISA检测 7

9.2 线虫检测 7

9.2.1 现场检疫 7

9.2.2 实验室检验 7

9.2.2.1 样品分离 7

9.2.2.2 线虫分离 7

9.2.2.3 显微镜检查 7

9.2.2.4 形态鉴定特征 7

9.2.3 分子检测 7

9.2.3.1 DNA粗提 7

9.2.3.2 PCR检测 7

9.2.3.3 对照设置 7

9.2.3.4 琼脂糖凝胶电泳检测 8

9.3 不合格材料处置 8

10 保存 8

10.1 常温保存 8

10.1.1 保存材料 8

10.1.2 保存容器 8

10.1.3 保存条件 8

10.1.4 保存数量 8

10.1.5 继代时间 8

10.2 低温保存 8

10.2.1 保存材料 8

10.2.2 保存容器 8

10.2.3 保存条件 8

10.2.4 保存数量 9

10.2.5 继代时间 9

10.3 超低温保存 9

10.3.1 保存材料 9

10.3.2 保存数量 9

10.3.3 预培养 9

10.3.4 分离无菌茎尖 9

10.3.5 装载 9

10.3.6 脱水 9

10.3.7 快速冷冻保存 9

10.3.8 化冻 9

10.3.9 卸载 9

10.3.10 再生 9

11 技术指标 10

11.1 常温保存 10

11.2 低温保存 10

11.3 超低温保存 10

11.4 无害代 10

11.5 挽救 10

12 种质资源信息管理 10

12.1 种质资源信息 10

12.2 数据信息管理 10

12.3 纸质档案建立 10

附 录 A 11

附 录 B 12

附 录 C 13

附 录 D 15

附 录 E 16

附 录 F 17

前  言

本文件按照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》的规定起草。

本文件替代NY/T 1690-2009《蕉种质资源离体保存技术规程》。

本文件与NY/T 1690-2009相比主要差异如下：

----增加3.1 外植体explant

----增加3.2 继代subculture

----增加3.3 无害化（除害）decontamination

----增加3.4 繁育breeding

----增加3.5 挽救rescue

----修改了4.2 利用聚合酶链式反应（PCR）、反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）和酶联免疫吸附试验（ELISA）方法检测，确保材料不带香蕉花叶心腐病毒（CMV）和束顶病病毒（BBTV）。

----增加5 香蕉种质资源离体保存程序

----增加6 资源采集与包装。

----增加7 无害化（除害）。

----增加8 挽救。

----增加9 检测。

----增加11.4 无害化。

----增加11.5 挽救。

----增加B、C、D、E附录。

----调整了标准的结构。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件的附录B、E为资料性附录，附录C、D为规范性附录。

本文件由农业农村部农垦局提出。

本文件由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所，中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。

本文件主要起草人：李志英，徐立，符运柳，武华周，孙进华，杨庆全，陈浪欣，孟春阳，王小冰，王加宾，王敏瑞，王诗倩，黄碧兰，朱振芬。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

----2009年首次发布为NY/T 1690-2009；

本次为第一次修订

香蕉种质资源离体保存技术规程

1. 范围

本文件确立了香蕉（*Musa nana* Lour.）种质资源离体保存技术程序，规定了基本要求、资源的采集及包装、无害化处理、挽救、检测、保存等要求，描述了档案管理等追溯方法。

本文件适用于香蕉种质资源的采集、无害化（除害）处理、挽救、保存。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/T357 香蕉 组培苗

NY/T1690 香蕉种质资源离体保存技术规程

1. 术语和定义

NY/T357和NY/T1690中确立的及下列术语和定义适用于本文件。

* 1. 外植体explant

在组织培养中，用于初始培养以产生无菌体系的茎尖、顶芽、分生组织和胚等材料的统称。

* 1. 继代subculture

对来自外植体所增殖的培养物（包括细胞、组织或其切段）通过更换新鲜培养基及不断切割或分离，进行连续多代培养的过程。

* 1. 无害化（除害）decontamination

通过表面消毒、残余物杀灭、低温脱毒、材料无菌培养等技术，获得不含真菌、细菌、病毒、病原线虫等生物的健康资源的过程。

* 1. 繁育breeding

通过组织培养技术扩繁香蕉资源的过程。

* 1. 挽救rescue

通过茎尖培养、杀菌处理等技术，将损坏严重、腐烂、发霉等状态不良的材料，培育为健康种苗的过程。

* 1. 常温保存normal temperature conservation

在（25±2）℃下保存正常生长离体培养物的方式。

* 1. 低温保存low temperature conservation

在（16±1）℃下，通过改变培养基成分和光照条件保存缓慢生长离体培养物的方式。

* 1. 超低温保存cryopreservation

在液氮（-196℃）中保存代谢和生长几乎完全停止、生物学状态相对稳定的离体培养物的方式。

1. 基本要求
	1. 用于种质资源保存的材料必须保证品种纯正，来源可靠。
	2. 利用聚合酶链式反应（PCR）、反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）和酶联免疫吸附试验 (ELISA）方法检测，确保材料不带香蕉花叶心腐病毒（CMV）和束顶病病毒（BBTV）。
	3. 种质未发生变异。
	4. 详细登记材料情况（见附录A）。
		1. 名称：种质名、品系名、地方名。
		2. 产地：原生地。
		3. 引种情况：来源地、引种人、原保存单位、原保存单位编号、引种时间。
		4. 种质编号：国家统一编号、引种号、采集号、保存号。
		5. 保存情况：保存材料、保存者、保存数量、继代时间、继代次数、操作人。
2. 香蕉种质资源离体保存程序

 保存过程主要包括资源的采集、无害化处理、资源的挽救、检测和保存5个过程，处理材料类型包括吸芽、种子和试管苗，详细流程如下：



1. 资源的采集及包装
	1. 采集材料类型

选择符合4.1的种质材料并按4.2详细登记。

* + 1. 吸芽

吸芽来源于无明显病虫害、健壮、特征明显的母株，优先选取地面上叶片未展开的笋状芽，其次选择高度较低的吸芽。

* + 1. 果实

果实来源于无明显病虫害、健壮、特征明显的母株。成熟且外观完整，无腐烂现象。

* + 1. 试管苗

试管苗选取健壮、无污染、包装完好的植株。

* 1. 资源采集
		1. 吸芽采集

取完整吸芽，假茎和肉质茎各保留4 cm～5 cm，剥除干枯、腐烂的叶鞘，晾干表面水分（见附录B）。

* + 1. 种子采集

直接剪取完整无腐成熟果实或从果实中分离出种子，清洗、晾干表面水分后包装。

* 1. 资源包装

资源的包装应满足能够抗挤压、保湿、防霉等要求。

* + 1. 包装材料

包装材料要具有透气、柔软、吸水性好、清洁、不易发霉腐烂、保湿性强等特性，包装材料易获得，且允许用于邮寄或运输。

* + 1. 包装

资源包裹打包后，要在包装明显位置标注采集的种质类型、日期、地点、采集人等关键信息。

1. 无害化（除害）
	1. 病虫害类型
		1. 主要病害

《中华人民共和国进境植物检疫禁止进境物名录》（2018）、《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》（2021）中涉及的香蕉可能携带的病害，包括香蕉束顶病、黑叶斑病和枯萎病等。

* + 1. 主要虫害

《中华人民共和国进境植物检疫禁止进境物名录》（2018）、《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》（2021）中涉及的香蕉可能携带的虫害，包括钻穴线虫、象鼻虫、雀斑虫等。

* 1. 不同材料的无害化方法
		1. 吸芽无害化
			1. 取材方法

取吸芽顶芽或其侧芽，去除表层组织，使用75%酒精消毒后，剥取0.5 mm左右的茎尖，接种到培养基。

* + - 1. 培养条件

培养基为MS+6-BA 2.0～3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8，在温度25℃条件下黑暗培养。

* + - 1. 繁育

参照行业标准NY/T357的4.2外植体诱导与继代培养。

当暗培养的材料开始分化时，用相同培养基继代，在25℃，光照强度300 lx～500 lx的条件下，以8～10小时/天的光照周期培养。

继代次数、后期光照强度、光照周期和培养温度，参照行业标准NY/T357的4.2.2继代次数和培养周期。继代培养不超过15代，光照强度1000 lx～3000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + - 1. 生根培养

参照行业标准NY/T357的4.3生根培养。

培养基：1/2MS+NAA 0.1～0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。容器为宽12 cm，高16 cm大小的塑料组培袋。

培养条件：光照强度1000 lx～3000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + - 1. 残余物的处理

收集剥取茎尖过程中产生的切除组织、包装材料、已用无菌纸、已用手套等所有接触过材料的残余物，在高压灭菌锅中121℃处理20分钟，彻底杀灭材料所携带的各类生物。

* + 1. 种子无害化
			1. 取材方法

去掉包装后，妥善收集包装材料。

将种子用洗涤剂浸泡10分钟，流水冲洗10分钟，吸干水分后，于超净工作台上用次氯酸钠消毒20分钟，用无菌水冲洗5次，无菌纸吸干水分，借助解剖镜，小心剥取胚，接种到培养基上。

* + - 1. 培养方法

培养基为MS+6-BA 20～30 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。φ90 mm，高2 cm的一次性塑料培养皿。温度25℃，黑暗培养。

* + - 1. 繁育

参照行业标准NY/T357的4.2外植体诱导与继代培养。

当暗培养的材料开始分化时，用相同培养基继代，在25℃，光照强度300 lx～500 lx的条件下，以8～10小时/天的光照周期培养。

继代次数、后期光照强度、光照周期和培养温度，参照行业标准NY/T357的4.2.2继代次数和培养周期。继代培养不超过15代，光照强度1，000 lx～3，000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + - 1. 生根培养

参照行业标准NY/T357的4.3生根培养。

培养基：1/2MS+NAA 0.1～0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。容器为宽12 cm，高16 cm大小的塑料组培袋。

培养条件：光照强度1，000 lx～3，000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + - 1. 残余物的处理

同7.2.1.5。

1. 挽救
	1. 材料
		1. 试管苗

需挽救的试管苗包括但不限于：主体部分变黑、枯黄、芽心变黑等活力部分丧失的材料。

* + 1. 吸芽

需挽救的吸芽包括但不限于：采集处理产生断裂的吸芽、顶芽被破坏或丢失的吸芽、已产生发霉或腐烂的吸芽、切块太小的吸芽、材料干枯的吸芽等。

* 1. 挽救
		1. 试管苗挽救
			1. 取材方法

取需挽救的试管苗，去除上部叶片和基部根系，将芽纵切后，再切除变黑部分，接种到培养基上；对于枯黄的试管苗，切掉上部及外部叶片后，在解剖镜下剥取1～3 mm大小的茎尖，接种到培养基上

* + - 1. 培养方法

培养基为MS+6-BA 2.0～3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。温度25℃，暗培养

* + - 1. 繁育

参照行业标准NY/T357的4.2外植体诱导与继代培养。

当暗培养的材料开始分化时，在相同培养基上继代，25℃，弱光，光照强度300 lx-500 lx，8～10小时/天的光照周期。

继代次数、后期光照强度、光照周期和培养温度，参照行业标准NY/T357的4.2.2继代次数和培养周期。继代培养不超过15代，光照强度1，000 lx～3，000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + - 1. 生根培养

参照行业标准NY/T357的4.3生根培养。

培养基：1/2MS+NAA 0.1～0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。容器为宽12 cm，高16 cm大小的塑料组培袋。

培养条件：光照强度1，000 lx～3，000 lx，光照时间为8～12小时/天，温度27±2℃。

* + 1. 吸芽挽救
			1. 取材方法

取可用的吸芽（见附录B，图B.1），观察是否有顶芽或侧芽（见附录B，图B.2），切掉表层组织，表面用75%酒精擦拭消毒后，于超净工作台晾干，借助解剖镜，小心剥取0.5 mm左右的茎尖，接种到培养基。

* + - 1. 培养方法

培养基为MS+6-BA 2.0～3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+卡拉胶7 g/L，pH 值为5.8。温度25℃，黑暗培养。

* + - 1. 二次处理方法

对于腐烂材料的茎尖，需要二次处理，第一次处理后的茎尖，在初代培养基上培养中，出现肉眼可见的菌脓时，在二次继代时，在采用相同培养基的表面滴加杀菌剂（PPM）10 μL～20 μL，把细菌污染的茎尖插入到有杀菌剂液滴的培养基中，在6.3.2.2的条件下继续培养。

* + - 1. 繁育

同7.2.1.3。

* + - 1. 生根培养

同7.2.1.4。

* + - 1. 残余物的处理

同7.2.1.5。

收集剥取茎尖过程中产生的切除组织、包装材料、已用无菌纸、已用手套等所有接触过材料的残余物，在高压灭菌锅中121℃处理20分钟，彻底杀灭材料所携带的各类生物。

1. 检测

经过挽救、除害后繁育的香蕉苗，可以排除多种细菌、真菌和昆虫的可能性，但不能确保是否含有肉眼不可见的病毒、线虫类生物。

* 1. 病毒检测

检测香蕉束顶病病毒和香蕉花叶病病毒。参考行业标准NY/T2251.2012病毒分子检测技术规范。

本文件提供了需要设备简单、操作方便、速度快的PCR检测和ELISA两种方法。

* + 1. 分子检测

 每一个保存的编号送其中1个芽进行病毒检测，带病芽允许率为0。

* + - 1. BBTV病毒分子检测

BBTV采用PCR方法，检测应设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染BBTV的植物组织作阳性对照，用 ddH20 作空白对照。

取香蕉无菌生根苗叶片0.1 g，采用CTAB法提取DNA，以提取的叶片DNA为模板进行PCR扩增。

具体操作步骤（见附录C）。当使用商品化检测试剂盒时，参照试剂盒使用说明进行操作。

* + - 1. CMV的RT-PCR扩增

 CMV采用反转录PCR法（RT-PCR）扩增。设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染BBTV的植物组织作阳性对照，用 ddH20 作空白对照。

取香蕉无菌生根苗叶片0.1 g，采用CTAB法提取RNA，反转录合成cDNA。以合成的cDNA为模板进行扩增。

具体操作步骤（见附录C）。当使用商品化检测试剂盒时，参照试剂盒使用说明进行操作。

* + - 1. PCR 产物凝胶电泳检测

各组分PCR扩增完毕后，进行1%（W/V）的琼脂糖凝胶电泳检测。

* + - 1. 结果判定

阳性对照、阴性对照与空白对照正确，待测样品出现目标条带，判定为阳性。阳性对照、阴性对照与空白对照正确，待测样品未出现目标条带，判定为阴性。

* + 1. ELISA检测

ELISA检测设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染BBTV和 CMV的植物组织作阳性对照，用样品提取缓冲液作空白对照。其中，阴性对照材料应该尽量与所检测样品一致。

具体操作步骤（见附录D）。当使用商品化检测试剂盒时，参照试剂盒使用说明进行操作。

* 1. 线虫检测

参考行业标准NY/T1485-2007香蕉穿孔线虫检测与鉴定技术进行形态检测，并利用分子方法进行检测。

* + 1. 现场检疫

对香蕉组培苗根及根茎部分进行检查，注意检查是否有变褐和坏死等症状，并送实验室进行香蕉穿孔线虫的检验。

* + 1. 实验室检验
			1. 样品分离

对于抽取的样品，仔细检查根部，尽量选取组培苗的根作为分离样品。

* + - 1. 线虫分离

用浅盘分离法或漏斗法分离线虫。

* + - 1. 显微镜检查

挑取线虫若干条制成临时玻片在生物显微镜下镜检，观察线虫的形态。

* + - 1. 形态鉴定特征

穿孔线虫形态及显微形态特征（见附录E）。

* + 1. 分子检测
			1. DNA粗提

以香蕉组培苗根及根茎部分采用改良的CTAB提取DNA。

* + - 1. PCR检测

25 μL特异性扩增PCR反应体系：DNA模板2 μL，上游引物PF（5’-TGTCATCGCCTTTGGCAGCT-3’）（10μM）0.7 μl，下游引物PR（5’-TGGTAAACGACCCTGAACCAG-3’）（10μM）0.7 μL，2×mix酶10μL，其余用超纯水补足。进行PCR扩增。

反应程序为：94℃ 5 min；94℃ 30s, 56℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环；72℃ 8 min，4℃保存。

* + - 1. 对照设置

设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用纯化培养的线虫为阳性对照，用 ddH20 作空白对照。

* + - 1. 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR反应结束后，取5 μL产物进行1%（W/V）的琼脂糖凝胶电泳检测。进行观察、拍照和记录，若出现271bp的特异性片段说明有香蕉穿孔线虫的存在。

* 1. 不合格材料处置

通过检测合格的材料进行保存，处理后仍达不到保存条件的，视材料质量可进行再次的无害化处理，若材料已无法使用，按7.2.1.5 残余物的处理方式处理。

1. 保存

用于保存的材料全部为经过检测不带有真菌、细菌、病毒、线虫等的试管苗。

* 1. 常温保存
		1. 保存材料

 选择符合4.1、4.2和4.3的种质材料并按4.4详细登记，经表面消毒后在无菌条件下切取大小约0.5 cm的生长点组织，按照常规组织培养方法进行外植体诱导、增殖（继代）培养，繁殖出的试管苗用作香蕉离体保存的材料。

* + 1. 保存容器

采用规格为18 mm～25 mm×160 mm～180 mm的试管，用内置硅胶圈的密封塑料盖封口，用标签写明种质编号。

* + 1. 保存条件

保存温度（25±2）℃，光照强度350 lx～500 lx，光照时间8小时/天～12小时/天，培养基为：MS+蔗糖30 g/L+6-苄基腺嘌呤（6-BA）1.12 mg/L+α-萘乙酸（NAA）0.175 mg/L，pH 5.8。每管加培养基15 mL～20 mL。

* + 1. 保存数量

每份种质保存10管以上，每管1个丛芽。

* + 1. 继代时间

每2～3个月继代1次。

* 1. 低温保存
		1. 保存材料

同10.1.1。

* + 1. 保存容器

同10.1.2。

* + 1. 保存条件

保存温度（16±1）℃，光照强度300 lx～350 lx，光照时间12小时/天，培养基为：MS+蔗糖50 g/L+6-苄基腺嘌呤（6-BA）1 mg/L+吲哚乙酸（IAA）0.1 mg/L，pH 5.8。每管加培养基15 mL～20 mL。

* + 1. 保存数量

每份种质保存10管以上，每管1个丛芽。

* + 1. 继代时间

每12～15个月继代1次。

* 1. 超低温保存
		1. 保存材料

选择符合MY/T 357 规定的一级标准的组培生根苗作为超低温保存的材料。

* + 1. 保存数量

每份种质保存10管以上，每管5～7个茎尖。

* + 1. 预培养

将9.3.1的试管苗在MS+30 g/L蔗糖的固体培养基上预培养，培养条件为温度（25±2）℃，光照时间16小时/天，光照强度600 lx～800 lx，时间为30天～45天。

* + 1. 分离无菌茎尖

 选取预培养后假茎粗为0.5 cm~0.8 cm的健康生根植株，在无菌条件下剥取0.8 mm～1.0 mm茎尖。

* + 1. 装载

将无菌棉纸（1.5 cm～2 cm×1.5 cm～2 cm）放置在培养皿中，用装载液（见附录F的1）湿润。将5～7个茎尖包在棉纸中，迅速浸入装载液中，在22℃～25℃下暗处放置20分钟～30分钟后取出，用无菌滤纸去除多余的装载液。

* + 1. 脱水

将棉纸团浸在预冷的PVS2溶液（见附录F的2）中，冰浴20分钟。

* + 1. 快速冷冻保存

 将冰浴后的棉纸团放入装满新鲜制备的用冰预冷的PVS2溶液的小塑料冻存管中，拧紧螺旋盖后，用一层封口膜封口，迅速将冷冻管浸入液氮中保存。

* + 1. 化冻

在无菌条件下，将冷冻保存管在1 s内从液氮中转移到40℃的水浴中，剧烈振荡90 s，然后在超净工作台上将包有茎尖的棉纸团从冷冻管中取出，在灭过菌的干燥滤纸上放置30 s。

* + 1. 卸载

将棉纸团转移到卸载液（见附录 F的3）中，在22℃～25℃下放置10分钟，每隔5分钟换一次卸载液。然后将棉纸团展开，茎尖在卸载液中再悬浮5分钟。

* + 1. 再生

取两张灭过菌的滤纸，平铺于培养皿内的半固体MS+100 g/L蔗糖的培养基上；将茎尖从卸载液中捡出，放于滤纸上，在22℃～25℃下，放置12小时～18小时后，再将茎尖转移到半固体MS+30 g/L蔗糖+0.5 mg/L6-BA 的培养基上，暗培养10天～15天；然后在（25±2）℃，光照强度1，000lx～1，300 lx，光照时间16小时/天条件下培养40天～60天后，冷冻的茎尖就会发育成幼苗。

1. 技术指标
	1. 常温保存

变异率≤2%，无香蕉花叶心腐病和束顶病。

* 1. 低温保存

变异率≤2%，无香蕉花叶心腐病和束顶病。

* 1. 超低温保存

冻后现生率≥20%，变异率≤0.5%，无香蕉花叶心腐病和束顶病。

* 1. 无害代

无真菌，无细菌，无虫，无香蕉花叶心腐病和束顶病。

* 1. 挽救

存活率≥90%。无真菌，无细菌，无线虫，无香蕉花叶病和束顶病。

1. 种质资源信息管理
	1. 种质资源信息

种质资源信息包括但不限于种质名、品系名、地方名、原产地、来源地、引种人、引种时间、引种号、保存方法、保存数量和继代信息等（见附录A），并以此信息为基础建立数据与纸质档案。

* 1. 数据信息管理

建立香蕉种质资源离体保存信息管理系统，主要的种质资源信息录入计算机，建立种质资源数据库，具备资源查询、资源信息增删、相关继代记录、保存事件记录、数据统计、导入/导出数据等功能，信息系统具有信息安全相关组件或功能。

* 1. 纸质档案建立

种质资源入库保存过程中的相关原始纸质记载表,按库编号或种质入库时间顺序装订成册,建立原始记录纸质档案.

# 附 录 A

（资料性）

表A.1 香蕉种质资源离休保存登记表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 种质名 |  | 品系名 |  |
| 地方名 |  | 原产地 |  |
| 来源地 |  | 原保存单位 |  |
| 原保存单位编号 |  | 引种人 |  |
| 引种时间 |  | 引种号 |  |
| 国家统一编号 |  | 采集号 |  |
| 保存号 |  | 保存方法 |  |
| 保存材料 |  | 保存者 |  |
| 继代次数 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 继代时间 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 保存数量 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 操作人 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

# 附 录 B

（资料性）

吸芽采集参考对照



图B.1小吸芽的采集方法

1. 上图中，左边的吸芽假茎保留长度为5cm~6 cm，肉质茎保留了3 cm，为标准采集方法。右边吸芽假茎没有处理，肉质茎长度不足1 cm（以肉质茎中心位置的长度为准）。



图B.2假茎截面图

1. 左图为未分化花芽的吸芽，具有明显的螺纹。右图为分化花芽的吸芽，截面光滑，没有假茎中心点。



图B.3大吸芽处理后的标准状态

1. 以鞘叶基部为起点，上下各保留4 cm~5 cm，直径10 cm。

# 附 录 C

(规范性)

PCR和RT-PCR 方法

1 DNA和RNA提取

采用改良的CTAB法，从香蕉在组培苗叶片中提取总RNA和DNA。

提取的总RNA和DNA必须在2h内进行PCR检测，若需长期保存须放置-80℃冰箱。

采用 RNA 与 DNA 提取试剂盒的，操作步骤参照产品说明书。

2 反转录合成cDNA

先将RNase-freeWater、Achored Oligo（dT）18 Primer与RNA混合均匀后，置于PCR仪上65℃反应5 min后，立即将反应混合物置于冰上静置2 min，按表C-1加入其它的反应组分。

表C-1反转录合成cDNA体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 用量 |
| Achored Oligo（dT）18 Primer2ⅹReaction MixTransScript® RT/RI Enayme MixgDNA RemoverRNARnase-free WaterTotal | 1 μL10 μL1 μL1 μL5 ng-5 μgVariable10 μL |

轻柔混匀后，放置PCR仪42℃反应30 min；85℃反应5 s，使TransScript® RT/RI Enayme Mix和gDNA Remover失活，冰上冷却。

加入ddH2O将其稀释5倍后为模板。

3 引物序列

表C-2检测引物序列

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 名称 | 引物序列 |  | PCR产物大小（bp） |
| BBTV | 组分I | B1L | 5'AAAGGGGAGCCAAGAAGAAG3' |  | 607 |
|  | B1R | 5'CGGAAGGAAGTTAGCCATGA3' |  |
| 组分Ⅲ | B3L | 5'ATCAAGAAGAGGCGGGTT3' |  | 490 |
|  | B3R | 5'TCAAACATGATATGTAATTC3' |  |
| 组分IV | B4L | 5'CAACAGAGCGGGTGCAAC3' |  | 326 |
|  | B4R | 5'GTTTCCTCGTCTTCCTTG3' |  |
| CMV | - | 5'-CACCCAACCTTTGTGGGTAG-3' |  | 557 |
| 5'-CAACACTGCCAACTCAGCTC-3 |  |

4 PCR扩增

采用 PrimeSTAR® MaxDNA聚合酶（高保真酶），以 cDNA或DNA为模板对目标基因进行扩增。PCR反应体系如表2-3。

表C-3目的片段扩增体系

Table C-3 Target fragment amplification system

|  |  |
| --- | --- |
| 组分Component | 用量Volume |
| PrimeSTAR® Max DNA PolymerasePrimer FPrimer FcDNAddH2O | 10 μL0.5 μL0.5 μL1 μL8 μL |

②PCR反应的程序：BBTV：组分Ⅰ：94℃ 4 min：94℃ 1 min，68℃ 1 min，72℃ 1 min，共35个循环；72℃ 10 min；组分Ⅲ：94℃ 4 min；94℃ 1 min，5℃ 1 min，72℃ 1 min，共35个循环；72℃ 10 min；组分Ⅳ:94℃ 4 min：94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 30 s，共35个循环；72℃ 10 min。CMV：PCR扩增条件为：94℃ 4 min；94℃ 1 min，58℃ 1 min，72℃ 1 min，共35个循环；72℃ 10 min。

5 琼脂糖凝胶电泳检测

取5 μL的RNA溶液在110 V和220 mA的条件下进行琼脂糖凝胶电泳，25 min。

6 结果判定

阳性对照、阴性对照与空白对照正确，待测样品出现目标条带，判定为阳性。

阳性对照、阴性对照与空白对照正确，待测样品未出现目标条带，判定为阴性。

# **附 录** **D**

（规范性）

ELISA检测方法

1 准备抗原

取待测样品和阴性对照、阳性对照的叶片用抗原包被缓冲液配制1:10（0.1 g叶片/1 mL包被缓冲液）的样品悬浮液，3000 rpm低速离心后备用。

2 加样

在酶联板上加样，每孔100 μL，每个样品重复两次，并设空白对照，于4℃冰箱保湿过夜（或25℃温箱孵育3～5h，或37℃孵育2h）。

3 洗板

甩去酶标板上各孔中的液体，用PBST洗3次酶标板，每隔5分钟洗1次，每次每孔加PBST各300 μL，最后一次洗完将酶标板上洗涤液甩干。

4 抗体稀释

用IgG稀释缓冲液将 CMV、BBTV特异抗体以1:1500和1:2000的倍数进行稀释，4℃保存备用。

5 加特异抗体

在酶标板上每孔加入100 μL稀释后的抗体，各重复1次；37℃恒温箱中孵育2h。

6 加入酶标抗体

洗板3次后，加酶标抗体。每孔加入用血清稀释液按1:2000比例稀释的酶标抗体液100 μL，在37℃电热恒温培养箱中孵育2小时。

7 加底物溶液

洗板3次后，加入底物溶液，每孔100 μL，置37℃电热恒温培养箱中避光10分钟显色。

8 记录数据，判断结果

目测判断方法：当样品的颜色与阳性对照颜色一致或深于阳性对照，样品判断为阳性。酶标仪读数判断方法：当样品OD490值≥阴性对照OD490值的2倍，样品判断为阳性。

# 附 录 E

（资料性）

穿孔线虫雌虫与雄虫形态特征

1 雌虫

——虫体长0.4 mm～0.9 mm，a值在20～30之间；头部低，不缢缩或稍缢缩，头架骨化显著；

——口针粗短，14μm～23μm，基部球发达；

——中食道球发达，后食道腺叶较长叶状从背部覆盖肠；

——侧区刻线3条～7条，非网格化；

——无颈乳突，侧尾腺孔常位于尾的前部；

——双生殖腺、对伸，或后生殖腺退化，精囊圆至卵圆形，内多有杆状精子；

——尾长圆锥形至亚圆柱形，长为肛门处体宽的2倍～4倍，末端窄圆至稍尖。

2 雄虫

——头部高，显著缢缩呈球状；

——口针和食道明显退化；

——交合企延伸到近尾端，极少延伸到尾端；

——引带大，伸出泄殖腔。

穿孔线虫雌雄虫体如下图：



图F.1香蕉穿孔线虫的形态特征图

1. A雄虫；B雌虫；C-D雌虫前部；E-F雄虫前部。

# 附 录 F

（资料性）

香蕉茎尖超低温保存溶液的配制

1 装载液

MS+184 mL/L甘油+137 g/L蔗糖，pH 5.8，0.22 µm滤膜过滤灭菌。

2 PVS2溶液

MS+300 mL/L甘油+150 mL/L乙二醇+150 mL/L二甲基亚砜（DMSO）+137 g/L蔗糖，pH 5.8，0.22 µm滤膜过滤灭菌。

3 卸载液

MS+411 g/L蔗糖，pH 5.8，0.22 µm滤膜过滤灭菌。

注：以上溶液所用试剂至少为分析纯级。