

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/ACCEM

团 体 标 准

T/ACCEM XXXX—XXXX

玉米单倍体诱导育种技术规程

Technical Regulations for Maize Haploid Induction Breeding

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国商业企业管理协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 单倍体的获得	1
5 单倍体鉴定	2
6 单倍体加倍	2
7 单倍体产生 DH 系评价方法及性状测定	3
8 注意事项	4

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。

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。

本文件由新疆农业大学提出。

本文件由中国商业企业管理协会归口。

本文件起草单位：新疆农业大学。

本文件主要起草人：。

玉米单倍体诱导育种技术规程

1 范围

本文件规定了玉米单倍体诱导育种过程中单倍体的获得、单倍体鉴定、单倍体加倍、单倍体产生 DH 系评价方法及性状测定、注意事项。

本文件适用于玉米单倍体育种相关实验及育种工作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

单倍体诱导

以玉米单倍体诱导系为父本，育种基础材料为母本，杂交产生单倍体籽粒的过程。

3.2

DH 系（双单倍体系）

单倍体经过染色体加倍后形成的纯合二倍体品系。

3.3

R1-nj 标记

一种用于鉴别单倍体的遗传标记，杂合幼胚呈紫红色，单倍体幼胚不显色。

4 单倍体的获得

4.1 材料种植

4.1.1 种植时间

新疆地区 5 月初开始种植，海南地区 11 月 20 号开始种植。

4.1.2 种植规格

采用 3 m 行长，0.7 m 行宽，播距 0.12 m~0.15 m，播种深度 3 cm~5 cm。

4.1.3 播种方法

使用点播枪进行点播，可在 PVC 软管上用红色胶布做间隔标记，把握每穴间隔，播种完成后立即浇水一次。

4.2 单倍体诱导

4.2.1 套袋处理

授粉前一天傍晚，使用硫酸纸袋对诱导系雄穗进行套袋，同时对目标群体雌穗提前套袋并减花丝。

4.2.2 授粉操作

授粉当天，待温度适宜时，采集诱导系花粉，将其授于已处理好的群体植株花丝上，授粉后及时套袋、挂牌并标注日期，为提高成功率需进行多次重复授粉。

注：套袋可减少风对花粉扩散的影响，获取更多花粉，但需注意避免高温导致花粉失活；授粉时需确保花丝均匀落满花粉，操作过程中避免杂粉污染。

5 单倍体鉴定

5.1 室内鉴定

5.1.1 果穗观察

对诱导后获得的果穗进行初步观察。

5.1.2 籽粒鉴定

通过籽粒颜色特征鉴定单倍体，单倍体籽粒顶部糊粉层表现为紫色，胚无颜色；二倍体籽粒顶部糊粉层和胚均为紫色；正常籽粒顶部糊粉层和胚均无紫色。

5.2 田间鉴定

5.2.1 幼苗特征

单倍体幼苗苗小苗弱，高度约为正常二倍体植株的一半，其根部为绿色，而二倍体幼苗根部为紫色。

5.2.2 鉴别时期

在五叶期和拔节期可依据上述特征轻松区分单倍体与二倍体，并及时除去二倍体植株。

6 单倍体加倍

6.1 流程

流程图如图 1 所示。

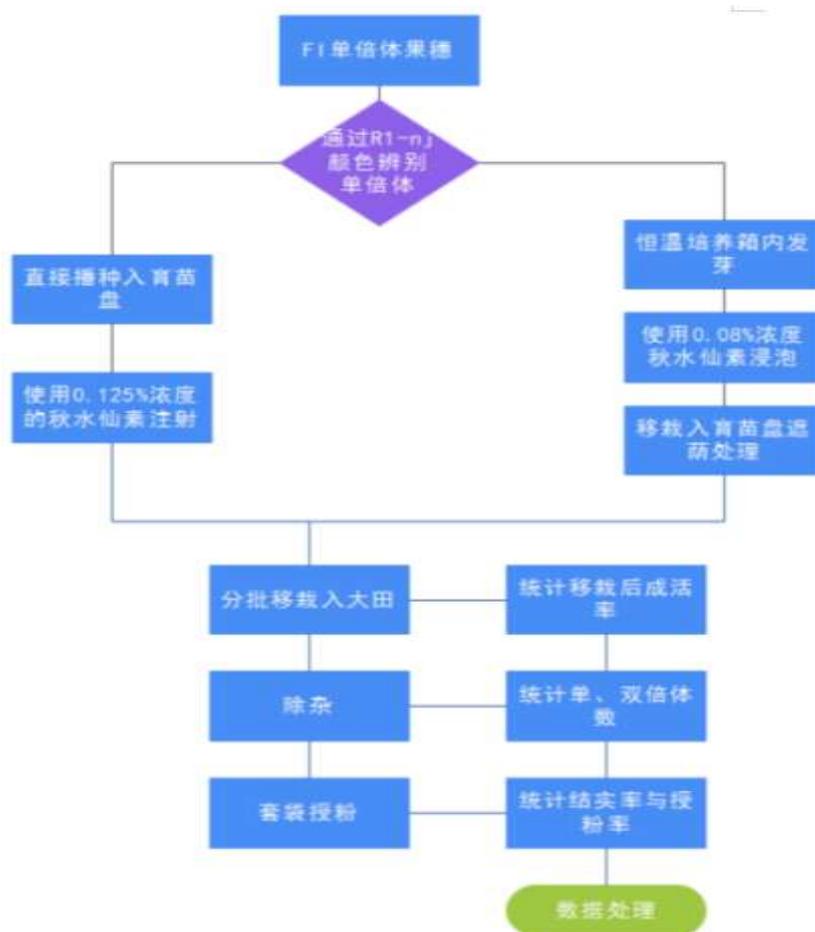


图1 流程图

6.2 注射

6.2.1 播种育苗

将实验材料直接播种入育苗盘，每穴一粒。

6.2.2 处理时期

待幼苗长至三叶一心期时进行处理。

6.2.3 试剂配制

使用 0.125% 秋水仙素与 0.5% DMSO 的混合溶液。

6.2.4 操作要点

用针管以斜上方 15° 角度插入幼苗根部，缓慢推注溶液，当看见珠心有液体时立即停止。

6.3 浸泡

6.3.1 发芽处理

将材料置于遮光恒温培养箱中发芽，每两日浇水一次。

6.3.2 处理时机

待芽长至 4 cm 后，减去胚芽鞘，将其装入网兜。

6.3.3 试剂配制

使用 0.08% 秋水仙素、2% DMSO 的混合溶液。

6.3.4 处理时间

在遮光环境下浸泡 12 h，之后取出用清水轻轻冲洗去除毒性，播种入育苗盘并进行遮荫处理，仍每两日浇水一次。

6.4 组织加倍

6.4.1 幼胚获取

在单倍体诱导授粉后 8 d 开始，每天连续剥胚。具体操作如下：

- a) 去除新收获玉米果穗的苞叶和花丝，用枪式镊子插入果穗顶部固定；
- b) 将果穗浸泡在 75% 乙醇中灭菌 5 min，取出待残留酒精较少时，装入保鲜袋置于无菌环境备用；
- c) 用手术刀切去籽粒顶部，在不伤及幼胚的前提下尽量切除顶部胚乳，然后用刀尖取出幼胚，整个过程需在无菌环境中操作，严防染菌。

6.4.2 培养处理

将获取的玉米幼胚置于不含或含有不同加倍试剂的 MS 培养基上连续培养 48 h，根据 R1-nj 标记挑选拟单倍体幼胚（无色幼胚）。

6.4.3 成苗移栽

将挑选出的拟单倍体幼胚放于不含加倍试剂的正常 MS 培养基上直接成苗培养，得到拟单倍体苗后进行田间移栽，在散粉期统计植株散粉情况，以雄穗散粉率衡量加倍效果，按式（1）计算：

$$\text{散粉率} = \frac{\text{散粉的双单倍体植株数}}{\text{双单倍体总植株数}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

7 单倍体产生 DH 系评价方法及性状测定

7.1 授粉结实

使用单倍体雄穗花粉对本株雌穗进行多次重复授粉，不能结实的单株记为雌穗不育株，能正常结实的单株记为雌穗可育株，所产生的籽粒为 DH 系籽粒。

7.2 育性评价

在植株经过播种、加倍、移栽后，统计成苗率，雌穗育性恢复由结实株率（HFFR）和平均结实籽粒数（AKN）进行评价，按式（2）、式（3）计算：

$$\text{HFFR} = \frac{\text{雌穗可育株数}}{\text{授粉株数}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{AKN} = \sum \frac{\text{每穗结实籽粒数}}{\text{授粉株数}} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

式中：

HFFR——雌穗育性恢复由结实株率，单位为%。

AKN——平均结实籽粒数。

7.3 成苗统计

在植株播种、加倍、移栽后，统计成苗率。

8 注意事项

- 8.1 秋水仙素具有剧毒，操作过程中应全程佩戴医用手套、口罩和护目镜。
- 8.2 恒温培养箱内温度较高，水分蒸发快，应经常换水。
- 8.3 秋水仙素应使用棕瓶盛装并进行遮光处理，同时滴加色素以便于防护。
- 8.4 育苗盘中播种种子后，应及时浇水，遵循少量多次的原则。
- 8.5 浸泡后的加倍种子苗小体弱，长期处于发芽皿中，不能直接暴露在阳光下，需搭建遮阳网进行遮荫。
- 8.6 对三叶一心幼苗进行注射时，针管斜上方 15° 插入根部，避免插穿，缓慢推注，看见珠心有液体时立即停止。
- 8.7 幼苗移栽时，每行移栽完成后需浇水至根部，防止因环境不适造成植株死亡。