



(21) 申请号 202111123202.1

审查员 荆丹丹

(22) 申请日 2021.09.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113826552 A

(43) 申请公布日 2021.12.24

(73) 专利权人 内蒙古农业大学

地址 010000 内蒙古自治区呼和浩特市赛罕区昭乌达路306号

(72) 发明人 王萍 李石恒

(74) 专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务

所(普通合伙) 61223

专利代理师 徐云侠

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法

(57) 摘要

本发明属于植物离体培养技术领域,具体公开一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法。包括以下步骤:S1、对去壳后的籽用西葫芦种子进行消毒处理;S2、将消毒后的种子接种于MS培养基中,使其萌发;S3、初代培养;S4、生根培养;S5、驯化与移栽。本发明提供的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,能够获得污染率低的籽用西葫芦组培苗,克服了种传病害的影响;且该方法成苗诱导时间短,生根植株根系发达,缩短了籽用西葫芦的育苗周期。



1. 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - S1、对去壳后的籽用西葫芦种子进行消毒处理;
  - S2、将消毒后的种子接种于MS培养基中,25±1℃、黑暗环境下培养使其萌发;
  - S3、初代培养:取萌发后的种子,横切子叶,取近下胚轴的1/2子叶,作为外植体;将所述外植体接种于添加有6-BA及TDZ的MS培养基中,置于25±1℃下培养14-28d,并控制光周期白天12-14h、夜间10-12h;  
其中,所述6-BA的添加量为2mg/L,所述TDZ的添加量为0.5-1.5mg/L;
  - S4、生根培养:将初代培养获得的组培苗接种于添加有6-BA及NAA的MS培养基中,置于25±1℃下培养10-20d,并控制光周期白天12-14h、夜间10-12h;  
其中,所述6-BA的添加量为0.5-2mg/L,所述NAA的添加量为0.5-1.5mg/L;
  - S5、驯化与移栽:当植株生长至3-7叶时,将培养装置半开1d或者全开1-2d或先半开1d再全开1d后进行移栽。
2. 根据权利要求1所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,S1中,所述消毒处理是将去壳的籽用西葫芦种子先置于质量分数75%乙醇溶液中表面消毒10-15s,无菌水冲洗3次;再用质量分数4%NaClO溶液消毒10-15min,无菌水冲洗6次。
3. 根据权利要求2所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,S1中,所述消毒处理是将去壳的籽用西葫芦种子先置于质量分数75%乙醇溶液中表面消毒15s,无菌水冲洗3次;再用质量分数4%NaClO溶液消毒15min,无菌水冲洗6次。
4. 根据权利要求1所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,S3中,所述TDZ的添加量为0.5mg/L。
5. 根据权利要求1所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,S4中,所述6-BA的添加量为2mg/L,所述NAA的添加量为0.5mg/L。
6. 根据权利要求1所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,所述控制光周期是白天14h、夜间10h。
7. 根据权利要求1所述的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,其特征在于,所述籽用西葫芦种子的品种为晶莹118、弘昌211、金丰八号、瑞丰九号或希望骄子。

## 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物离体培养技术领域,具体公开一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法。

### 背景技术

[0002] 籽用西葫芦是葫芦科、南瓜属一年生草本植物,原产北美洲南部,中国于十九世纪中叶开始从欧洲引入栽培,世界各地均有分布。其籽粒含有丰富的脂肪、蛋白质、矿物质及维生素等营养成分,籽用西葫芦籽粒中的粗脂肪含量40.4%~53.02%,不饱和脂肪酸含量56.44%~61.34%,亚油酸含量10.37%~51.19%、蛋白质含量达到34%~40%,具有较高的营养价值。此外,籽粒富含葫芦巴碱和丰富的钾、磷,具有防癌、降脂、降糖、止痒润肤的功效。《本草纲目》对南瓜子也有记载:南瓜子能驱虫,消肿,可治疗蛔虫、百日咳、痔疮等。在临床上,南瓜籽一直被认为是保持男性活力的重要天然食品,因为它含锌元素量很高,这是前列腺健康所需要的,南瓜籽粒是优良的保健食品。

[0003] 籽用西葫芦在陆地生产上存在受时间限制的影响,内蒙古等北方地区陆地生产需在5月下旬播种,7月上中旬授粉,九月中旬收瓜。采用离体快繁的方法,结合温室大棚栽培,可以克服时间上的限制,实现不同时期籽用西葫芦育苗生产。但是现有的籽用西葫芦从子叶接种到苗再生需要70天左右,周期较长。

[0004] 同时,近年来籽用西葫芦病害如病毒病、白粉病、枯萎病等危害加重,特别是病毒病,2016年以来在内蒙古、新疆、黑龙江等地普遍发生,减产达10%~50%,给农民及种子企业造成巨大损失。

[0005] 因此研究一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,以减少籽用西葫芦病害并缩短其繁育周期是十分有必要的。

### 发明内容

[0006] 针对以上技术问题,本发明提供一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,获得了污染率低的籽用西葫芦组培苗品种,实验经过种子消毒处理,在严格无菌的环境中,将其培养为脱毒苗,减轻了种传病害对籽用西葫芦的影响;并在较短时间内获得了生根植株,成苗诱导时间短,生根植株根系发达,缩短了籽用西葫芦育苗周期。

[0007] 本发明提供一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,包括以下步骤:

[0008] S1、对去壳后的籽用西葫芦种子进行消毒处理;

[0009] S2、将消毒后的种子接种于MS培养基中,25±1℃、黑暗环境下培养使其萌发;

[0010] S3、初代培养:取萌发后的种子,横切子叶,取近下胚轴的1/2子叶,作为外植体;将所述外植体接种于添加有6-BA及TDZ的MS培养基中,置于25±1℃下培养14-28d,并控制光周期白天12-14h、夜间10-12h;

[0011] 其中,所述6-BA的添加量为0.5-2mg/L,所述TDZ的添加量为0.5-1.5mg/L;

[0012] S4、生根培养:将初代培养获得的组培苗接种于添加有6-BA及NAA的MS培养基中,

置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养10-20d,并控制光周期白天12-14h、夜间10-12h;

[0013] 其中,所述6-BA的添加量为0.5-2mg/L,所述NAA的添加量为0.5-1.5mg/L;

[0014] S5、驯化与移栽:当植株生长至3-7叶时,将培养装置半开1d或者全开1-2d或先半开1d再全开1d后进行移栽。

[0015] 优选地,S1中,所述消毒处理是将去壳的籽用西葫芦种子先置于质量分数75%乙醇溶液中表面消毒10-15s,无菌水冲洗3次;再用质量分数4% NaClO溶液消毒10-15min,无菌水冲洗6次。

[0016] 优选地,S1中,所述消毒处理是将去壳的籽用西葫芦种子先置于质量分数75%乙醇溶液中表面消毒15s,无菌水冲洗3次;再用质量分数4% NaClO溶液消毒15min,无菌水冲洗6次。

[0017] 优选地,S3中,所述6-BA的添加量为2mg/L,所述TDZ的添加量为0.5mg/L。

[0018] 优选地,S4中,所述6-BA的添加量为2mg/L,所述NAA的添加量为0.5mg/L。

[0019] 优选地,所述控制光周期是白天14h、夜间10h。

[0020] 优选地,所述籽用西葫芦种子的品种为晶莹118、弘昌211、金丰八号、瑞丰九号或希望骄子。

[0021] 对比现有技术,本发明的有益效果为:

[0022] 1、本发明提供的籽用西葫芦离体快速繁殖方法,在萌发培养、初代培养及生根培养中污染率均较低,该方法对污染的控制效果好。

[0023] 2、现有的籽用西葫芦从子叶接种到苗再生需要70天左右,周期较长,本实验初代培养设置不同浓度6-BA与TDZ组合,发现两种激素组合具有促进其分裂分化及生根的双重作用。生根培养设置不同浓度6-BA与NAA,获得了根系发达(图5)、移栽易成活的组培苗;并采取子叶横切法,发现近下胚轴的1/2子叶成苗成苗效果优于远下胚轴的1/2子叶,表现为易成苗、成苗时间短。综合效果为:将籽用西葫芦从子叶接种到苗再生缩短为40d左右,缩短了籽用西葫芦组培育苗周期。

[0024] 3、实验经过种子消毒处理,在严格无菌的环境中,将其培养为脱毒苗,减轻了种传病害对籽用西葫芦的影响,为商业品种的研究开发与利用提供理论依据、为籽用西葫芦商用品种种苗产业化、市场化提供技术支持。

## 附图说明

[0025] 图1是初代培养后14天时各组植株株高;

[0026] 图2是初代培养后28天时各组植株株高;

[0027] 图3是初代培养后14天时各组植株株幅;

[0028] 图4是初代培养后28天时各组植株株幅;

[0029] 以上图1-4中T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9分别是指实施例1-9组,M1、M2、M3分别是指对比例1-3组,CK是指空白对照组;各组不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );

[0030] 图5是植株发达根系图;

[0031] 图6是植株成苗图;

[0032] 图7是驯化移栽中组培苗生长状况。

## 具体实施方式

[0033] 下面结合附图,对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

### [0034] 实施例1

[0035] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,包括以下步骤:

[0036] S1、选择品种为弘昌211的西葫芦种子,在50℃温水浸泡30min,去壳后将种子置于质量分数75%乙醇溶液中15s进行表面消毒,无菌水冲洗3次后再用质量分数4% NaClO溶液消毒15min,无菌水冲洗6次,完成消毒处理;

[0037] S2、将消毒后的种子接种于MS培养基中,每个培养瓶接种5-7粒种子25±1℃、黑暗环境下培养使其萌发;

[0038] S3、初代培养:萌发培养后,于超净工作台内小心移去籽用西葫芦幼苗下胚轴,用解剖刀横切子叶,将远下胚轴部分小心移除,取近下胚轴的1/2子叶,作为籽用西葫芦再生过程中的外植体;将该外植体接种于添加有6-BA及TDZ的MS培养基中,置于25±1℃下培养14d,并控制光周期白天14h、夜间10h;

[0039] 其中,6-BA的添加量为2mg/L,TDZ的添加量为0.5mg/L;

[0040] S4、生根培养:将初代培养获得的组培苗接种于添加有6-BA及NAA的MS培养基中,置于25±1℃下培养10-20d,并控制光周期白天14h、夜间10h;

[0041] 其中,所述6-BA的添加量为2mg/L,所述NAA的添加量为0.5mg/L;

[0042] S5、驯化与移栽:当植株生长至3-7叶时,将培养瓶全开1-2d后进行移栽。

### [0043] 实施例2

[0044] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:选择的籽用西葫芦种子的品种为金丰八号。

### [0045] 实施例3

[0046] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S3中的培养基中6-BA的添加量为0.5mg/L,TDZ的添加量为1.5mg/L。

### [0047] 实施例4

[0048] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S3中的培养基中6-BA的添加量为0.5mg/L,TDZ的添加量为0.5mg/L。

### [0049] 实施例5

[0050] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:控制光周期白天12h、夜间12h。

### [0051] 实施例6

[0052] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S3中外植体的培养时间为28d。

### [0053] 实施例7

[0054] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S4中的培养基中6-BA的添加量为0.5mg/L。

### [0055] 实施例8

[0056] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S4中的培养基中NAA

的添加量为1.5mg/L。

[0057] 实施例9

[0058] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S5中,将培养瓶先半开1d再全开1d后进行移栽。

[0059] 对比例1

[0060] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:籽用西葫芦种子的品种为金丰光板。

[0061] 对比例2

[0062] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:S3中的培养基中未添加TDZ。

[0063] 对比例3

[0064] 一种籽用西葫芦离体快速繁殖方法,与实施例1的不同在于:在初代培养中取远下胚轴的1/2子叶作为外植体。

[0065] 下面以实施例1为例,对本发明提供的籽用西葫芦离体快速繁殖方法的效果进行说明。

[0066] 1、种子萌发率、污染率及胚根长的测定

[0067] 按实施例1的方法对籽用西葫芦种子进行消毒处理,消毒后将种子接种于MS培养基中,设置5个培养瓶,每个培养瓶接种7粒种子,25℃、黑暗环境下培养使其萌发,此组作为观察组;同时选择品种为金丰光板的籽用西葫芦种子(即对比例1)作为对照组,两组种子萌发3-5d后,分别测定种子的萌发率、污染率及胚根长。结果如表1所示。

[0068] 表1种子萌发率、污染率及胚根长的测定

分组	萌发率(%)	污染率(%)	胚根数		
			>3cm	2-3cm	<2cm
[0069] 观察组	96	1	73	13	11
对照组	82	37	23	15	44

[0070] 2、初代培养获得的组培苗生长高度、株幅的测定

[0071] 对实施例1-6及对比例1-3中初代培养获得的组培苗的生长高度及株幅进行测定,结果如图1-4所示。

[0072] 上述实施例1中得到的籽用西葫芦植株发达根系图如图5所示,植株成苗图如图6所示,驯化移栽中组培苗生长状况如图7所示。

[0073] 3、子叶接种到苗再生周期

[0074] 以现有方法为对照进行说明,对照1参照“郭佳,李衍素,贺超兴,闫妍,于贤昌.南瓜高效再生体系的建立[J].植物学报,2019,54(4):539-546”中记载的方法;对照2参照“鲁晓晓.印度南瓜离体再生与遗传转化体系的优化[D].新乡:河南科技学院,2017.”中记载的方法。结果见表2。

[0075] 表2子叶接种到苗再生周期

[0076] 分组	时间(d)
-----------	-------

本实验	45
对照1	70
对照2	65
对比例1	70
对比例2	60
对比例3	60

[0077] 本实验从子叶接种到苗再生周期为45d左右,较对照1提供的南瓜高效再生体系的建立实验获得再生苗周期缩短25d左右,较对照2提供的印度南瓜离体再生实验获得再生苗周期缩短了20d左右。

[0078] 以上公开的仅为本发明的几个具体实施例,但是,本发明实施例并非局限于此,任何本领域的技术人员能思之的变化都应落入本发明的保护范围。

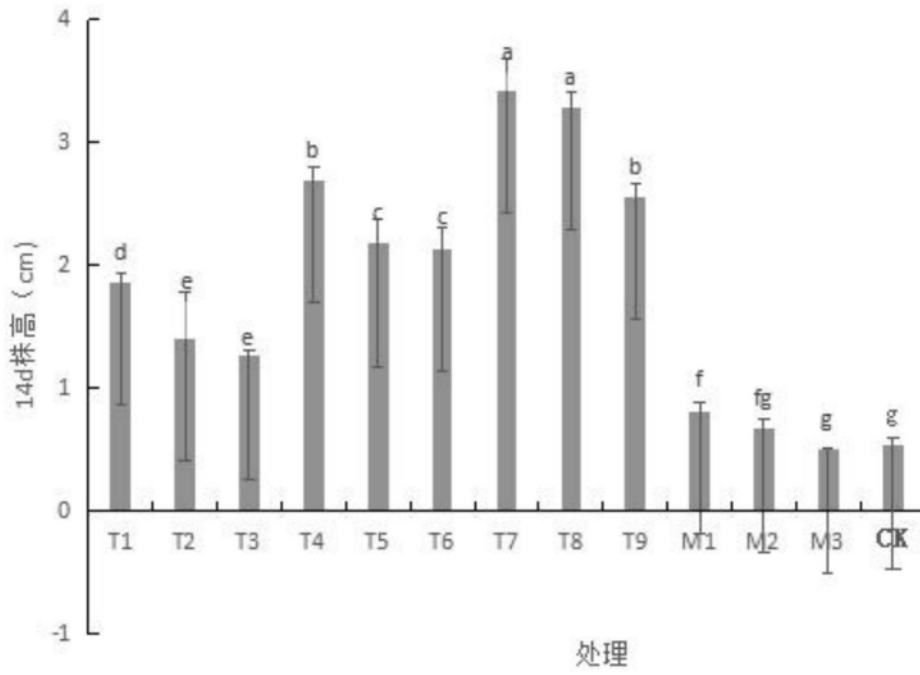


图1

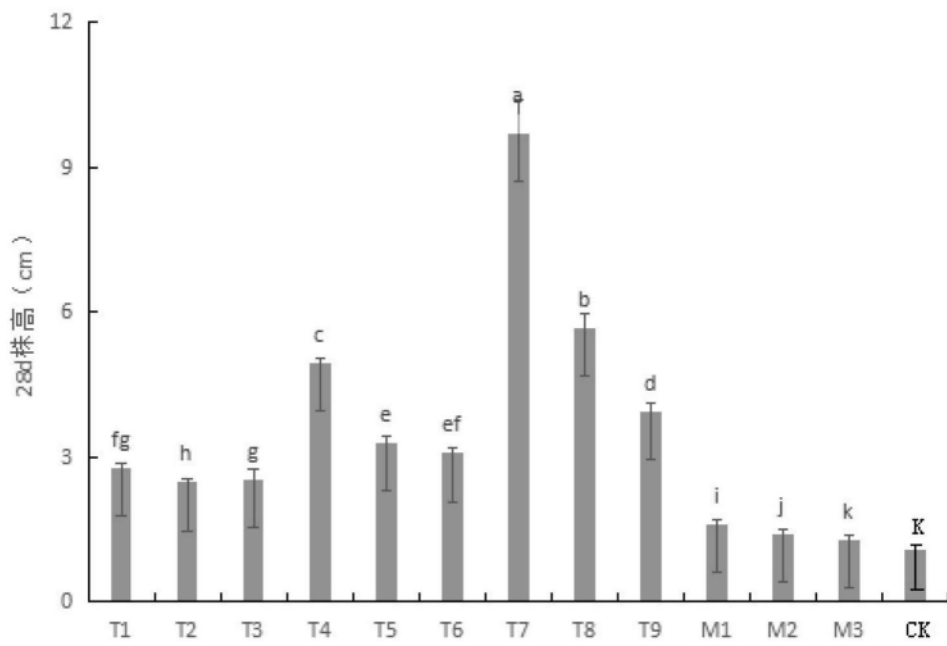


图2

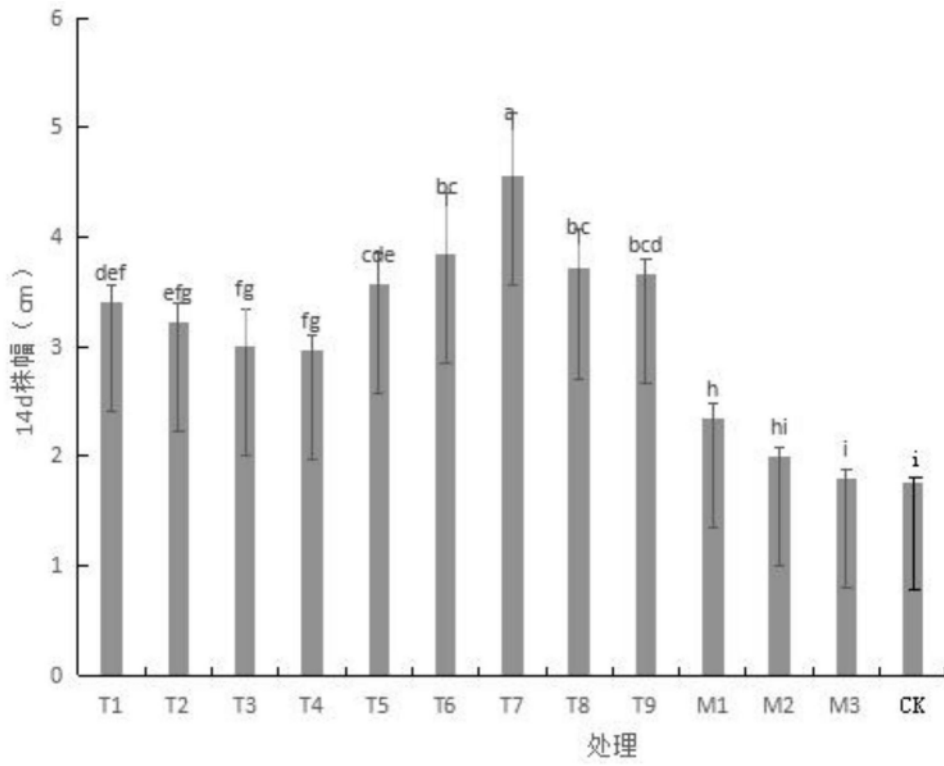


图3

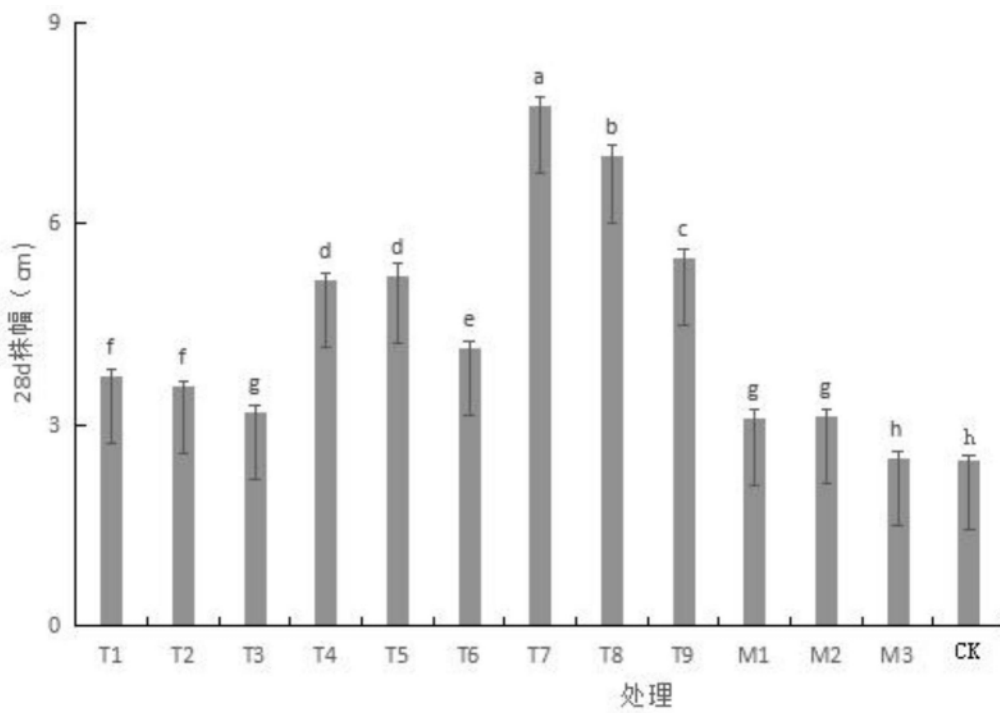


图4



图5



图6



图7