维普资讯 http://www.cqvip.com

分子植物育种，2007，第5卷，第3期，第384-388页
Molecular Plant Breeding, 2007, Vol.5, No.3, 384-388

研究报告
Research Report

夏枯草(*Prunella vulgaris*)组织培养和快速繁殖

张彦妮[1,2*] 陈立新[2] 付艳丽[1]
1 东北林业大学园林学院，哈尔滨，150040；2 黑龙江省农科院园艺分院，哈尔滨，150069
*通讯作者，zhangyanni808@126.com

摘 要 以夏枯草的叶片、茎节、顶芽为外植体在含不同浓度的6-BA和NAA的MS培养基中培养，比较其增值率和分化率。发现以茎节为外植体，诱导不定芽的最佳培养基为MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA，分化率为100%，增殖倍数为6.8。以顶芽为外植体，不定芽的最佳培养基为MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA或MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA，分化率分别为88.2%和84.6%，增殖倍数分别为5.8和6.2。最佳生根培养基为1/4MS + NAA 0.5 mg/L，生根率为100%。将生根的组培苗经过驯化移栽后，成活率为93%。表明，叶片难以分化；茎节的分化率效果最好；顶芽的分化能力介于二者之间。

关键词 夏枯草，组织培养，快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Prunella vulgaris*

Zhang Yanni[1,2*] Chen Lixin[2] Fu Yanli[1]
1 Landscape Architecture College of Northeast Forestry University, Harbin, 150040; 2 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Horticultural Branch, Harbin, 150069
* Corresponding author, zhangyanni808@126.com

Abstract In this study, leaves, stem internodes and apical bud of *Prunella vulgaris* used as the explants were placed on MS medium supplemented with different concentration 6-BA and NAA and then compared their rate of proliferation and differentiation. The best medium and hormone combination for apical bud and stem internodes was established. MS medium containing 3.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA suited proliferation culture for stem internode. The rate of differentiation was 100%, and the proliferation multiple was 6.8. MS medium containing 3.0 mg/L 6-BA and 0.05 mg/L NAA or MS medium containing 3.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA suited differentiation or proliferation culture for apical bud. The rate of differentiation was 88.2% and 84.6%, and the proliferation multiple was 5.8 and 6.2 separately. The best rooting medium was 1/4 MS medium with 0.5 mg/L NAA. The rooting rate was 100%. The seedlings with roots were transplanted after domestication. The surviving rate was 93%. The result showed that the different explants had differentiation capacity. The leaves were difficult to be induced and stem internode was easy to be induced.

Keywords *Prunella vulgaris*, Tissue culture, Rapid propagation

夏枯草(*Prunella vulgaris*)因其独特的生长周期而得名，又名棒距草、铁色草、大头花、夏枯头、蜂窝草、棒柱头草等，为唇形科多年生草本。高达30~40 cm。生长于草坡、荒地及路边草丛中。几乎遍于全国各地，主产于江苏、安徽、河南等省(殷兆荣, 1998, 吉林中医药, 15(5): 32)。夏枯草性寒，味苦辛，有清肝明目、消肿散结等功效。全草均可入药，是重要的中药材之一，常用于治疗目赤肿痛、头痛眩晕、乳痈、高血压、甲状腺肿大等(叶穗文, 2005, 国际医药卫生导报, 11(18): 111-113)。夏初时节开花，花冠多呈紫色，穗状花序在茎的顶端生出，长约2~4 cm，花为红紫色。果期为7~8月。用其半干燥果穗入药，为清热泻火药，具有软坚、散结的功用。由于夏枯草花期早，具有较高的观赏价值，在园林绿化中可以作为早春花卉应用，花期过后可以采收药用。夏枯草花多作药，以其为原料烹制成菜，

基金项目：本研究由黑龙江省博士后基金和黑龙江省青年基金(QC06C004)资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

似乎并不多见，但以夏枯草花入撰，疗疾、美食一举两得。因此夏枯草既可用来观赏，又可带来经济效益。

近年来，国内外对夏枯草的研究日益增多，尤其是在医药事业方面成果显著 (Gu et al., 2007; Harput et al., 2006; Pacheco et al., 1993)。目前已对夏枯草的药理作用，包括降血脂、降血压、降血糖、活血化淤、抗炎抗过敏作用以及其临床的应用具有一定的研究 (叶穗文, 2005, 国际医药卫生导报, 11(18): 111-113)。并从夏枯草的全草中分离并鉴定了 6 个单体化合物 (孟正木和何立文, 1995)。殷兆荣 (1998, 吉林中医药, 15(5): 32) 曾用夏枯草单味或配方治疗肝火上炎及炎火郁结所致的一些疾病。

夏枯草通常用种子、分株等方法繁殖。这些繁殖方法繁殖速度相对较慢，满足不了大规模生产的需要，加上繁殖材料携带母体病毒等原因，导致夏枯草品种严重退化，夏枯草产量、观赏价值和药性逐年下降，直接影响其在市场上的竞争力。而利用组织培养技术可以创造体细胞无性系变异，能够脱除病毒、真菌和线虫，并能够保持遗传上的稳定性，而且在良好的培养条件下，品种的优良性状能得到充分的发挥。

本研究通过系列实验建立夏枯草的组织培养再生体系，为实现夏枯草工厂化育苗奠定基础，从而为药用植物医学事业等方面提供材料来源。此外，夏枯草组织培养再生体系的建立，给夏枯草的品种改良和外源基因遗传转化奠定基础，同时对于保护夏枯草植物资源，实现其可持续性利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

夏枯草 (*Prunella vulgaris*) 种子 2005 年 9 月采自黑龙江省森林植物园内。

1.2 无菌苗的获得

取夏枯草的种子 60 粒，放入三角瓶内，加入少量洗涤剂和自来水，用纱布封口，反复摇晃、振荡，浸泡 30 min，然后用自来水冲洗 20~30 min；置超净工作台上，用 75% 的酒精处理 10~30 s，用无菌水冲洗 1~2 次；再用 1% 次氯酸钠消毒 12 min，无菌水冲洗 3~5 次。用无菌滤纸吸干材料表面的水分，然后用镊子将夏枯草的种子摆入装有 MS 培养基的三角瓶内，封口，放入培养室培养。实验中所有的培养基均附加 0.8% 的琼脂，3% 的蔗糖，pH 为 5.8。培养室温度为 23~25℃，光照强度为 3 000 Lux，光照时间 16 h/d。7 d 后观察并记录种子的发芽率和污染率。

1.3 外植体的筛选

将高 3~4 cm 的夏枯草幼苗，取其茎节、顶芽切割成 1.0 cm 长的切段，叶片切割成大小约为 0.5 cm × 0.5 cm 的切片，放入培养基 MS+ 2 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 上，观察外植体的分化情况。

1.4 继代增殖培养

将筛选出的外植体接种到继代增殖培养基 (表 1 和表 2) 上，进行不定芽的增殖和扩繁。每隔 7 d 观察一次。

1.5 无菌苗的生根诱导

当无菌苗长到约 2 cm 时将其转入生根培养基 (表 3) 中诱导其生根。10 d 后观察其生根情况。

1.6 无菌苗的驯化与移栽

将生长旺盛的生根无菌苗进行驯化移栽。移栽前，先打开封口膜放置 1~2 d，2 d 后，将无菌苗轻轻的从培养瓶内取出，洗掉附着在根部的培养基，移栽于经过高温灭菌的蛭石中，10 d 后观察其成活

表 1 夏枯草顶芽继代增殖结果

Table 1 Result of the maintenance and multiplication of the apical bud

培养基代号 Culture medium code	基本培养基 Basal culture medium	6-BA浓度(mg/L) 6-BA concentration	NAA浓度(mg/L) NAA concentration	接种外植体数(个) No. of inoculation	不定芽分化率(%) Additional buds differentiation rate	芽增殖倍数 Multiplication multiple of shoot
Y1	MS	1	0.01	15	53.3	3.5
Y2	MS	1	0.05	18	55.6	4.8
Y4	MS	2	0.01	18	72.2	4.2
Y5	MS	2	0.05	16	87.5	5.5
Y7	MS	3	0.05	17	88.2	5.8
Y8	MS	3	0.10	13	84.6	6.2

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 夏枯草茎节继代增殖结果

Table 2 Result of the maintenance and multiplication of stem internodes

培养基代号 Culture medium code	基本培养基 Basal culture medium	6-BA浓度(mg/L) 6-BA concentration	NAA浓度(mg/L) NAA concentration	接种外植体数 No. of inoculation (unit)	不定芽分化率(%) Additional buds differentiation rate	芽增殖倍数 Multiplication multiple of shoot
Y1	MS	1	0.01	17	58.8	3.8
Y2	MS	1	0.05	10	60.0	4.5
Y3	MS	1	0.10	15	60.0	5.0
Y4	MS	2	0.01	11	81.8	4.0
Y5	MS	2	0.05	16	87.5	5.5
Y6	MS	2	0.10	17	88.2	6.0
Y7	MS	3	0.05	18	94.4	6.5
Y8	MS	3	0.10	20	100.0	6.8

表 3 不定芽的生根诱导结果

Table 3 Result of root induced of additional buds

培养基代号 Culture medium code	基本培养基 Basal culture medium	NAA浓度(mg/L) NAA concentration	生根率(%) Taking root rate	根生长情况 Growth circs of root
S1	1/2MS	0.1	40	根生长较慢, 且较细弱 Roots were weak and grew slowly
S2	1/2MS	0.5	80	根生长较慢, 数量较多 Roots grew slowly and its number was great
S3	1/2MS	1.0	60	基部产生愈伤, 根数少 Base formed callus and a few roots
S4	1/4MS	0.1	50	根生长较慢, 数量较多 Roots grew slowly and its number was great
S5	1/4MS	0.5	100	根生长较快, 数量较多 Roots grew rapidly and its number was great
S6	1/4MS	1.0	80	基部产生愈伤, 根数少 Base formed callus and a few roots

率和生长情况。

1.7 有关指标的统计方法

(1) 萌发率 (%) = (发芽种子数 / 种子总数)×100%

(2) 污染率 (%) = (污染外植体数 / 接种外植体总数)×100%

(3) 生根率 (%) = (生根外植体数 / 接种外植体总数)×100%

(4) 芽增殖倍数 = 增殖后的总个数 / 接种时的总个数

(5) 不定芽分化率 (%) = (产生不定芽的外植体数 / 接种外植体数)×100%

2 结果与分析

2.1 无菌苗的获得

夏枯草的种子在接种 3 d 后开始有所膨大，种皮颜色变浅，2 周后种子的萌发情况见表 4。

2.2 外植体的筛选

实验结果 (表 5) 表明，所有的外植体的污染均是由于在外植体周围出现红色的物质所致，不同外植体污染程度有别。幼嫩叶片的污染率低，分化率为零，并且难以诱导成芽；老叶污染率较高，分化率为零，并且在叶片的周围出现红色的物质相对较多，只在外植体受伤处出现，这种红色的物质扩散很慢，因此推断这种红色的物质可能是夏枯草植物本身的代谢物。在接种 3 周后叶片仍无明显的变化，

表 4 夏枯草种子的萌发

Table 4 Seminal germination of *Prunella vulgaris*

外植体 Explant	接种数(粒) No. of inoculation	萌芽天数(d) Germination time	污染率(%) Pollution rate	萌发率(%) Germination rate
种子 seed	60	12~15	13.3	86

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5 外植体的选择结果
Table 5 Selection result of the explants

接种部位 Inoculating part	接种数量(个) No. of inoculation	污染率(%) Pollution rate	不定芽分化率(%) Additional buds differentiation rate
幼嫩的叶片 Tender leaf	25	12	0
较老的叶片 Aged leaf	25	24	0
顶芽 Apical bud	25	12	68
茎节 Stem internode	25	16	84

既不形成芽，也不产生愈伤组织。褐化严重，褐化率达到 95%，推测夏枯草叶片的褐化主要是由于植物体本身的影响。顶芽的污染率相对较低。茎节虽然污染率较高，但其分化率很高，在接种 6 d 时就有启动迹象，10 d 时在腋芽位置处长出小芽但数量不多。随着时间的延长，产生不定芽的数量逐渐增多。可见，茎节、顶芽比较适宜作为诱导分化的外植体。

2.2.1 顶芽的继代增殖培养

顶芽在接种 16 d 后开始有不定芽出现，所长新芽个体较小，生长速度较慢。从表 1 看出，在 NAA 浓度相同的情况下，6-BA 浓度越高，顶芽增殖倍数越高；在 6-BA 浓度为 1 mg/L 和 2 mg/L 时，NAA 浓度增加，顶芽的分化率增高。当 6-BA 为 3 mg/L，NAA 浓度增加，顶芽的分化率反而下降，但芽增殖倍数增加。在所有的培养基上芽生长良好。因此，较为适宜顶芽继代增殖的培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA +0.05 mg/L NAA 或 MS+3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。

2.2.2 茎节的继代增殖培养

对夏枯草的茎节进行继代增殖培养，培养结果见表 2 和图 1 (A 和 B) 所示。

从表 2 可以看出，6-BA 对夏枯草芽丛的诱导具有决定性作用。随着 6-BA 浓度的增加，茎节芽丛的分化率和增殖倍数增加。在 6-BA 浓度不变的情况下，随着 NAA 浓度增加，不定芽的分化率和芽增殖倍数幅度大，尤其是芽增殖倍数幅度最大，从 3.8 增加到 5.0。因此，对于茎节芽丛的增殖培养可以选用 MS+3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 作为增殖培养基。实验过程中发现，有些无菌苗的基部易出现红色的物质，但这种物质扩散很慢，推测可能是由于植物体本身的分泌物所致，这种现象有待进一步研究。

2.3 无菌苗的生根诱导

从表 5 可见，随着 NAA 浓度增加，生根率先增后减，在 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时，生根率相对较高。在 NAA 浓度相同的情况下，无菌苗在 1/4MS 培养基上的生根率高于在 1/2MS 培养基上的生根率。可见，对夏枯草来说，低盐浓度的培养基适合其生根培养。在实验过程中发现，在以 1/2MS 为基本培养基的组合中，生根所需时间较长，而且不定芽叶片生长很慢。在 1/4MS 的培养基上生长的组培苗生长较健康，添加 NAA 0.5 mg/L 时根的生长速度较

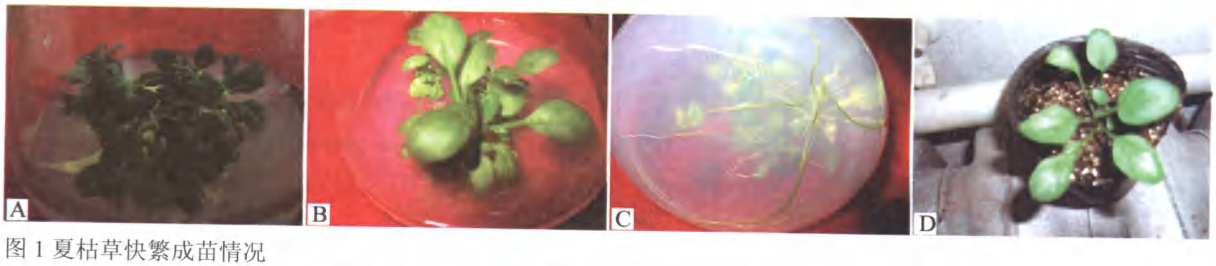

图 1 夏枯草快繁成苗情况
注: A: 茎节产生的不定芽; B: 生长中的不定芽; C: 生根的无菌苗; D: 无菌苗移栽后
Figure 1 Plantlets and rapid propagation of prunella vulgaris
Note: A: Additional buds induced from stem internodes; B: Growing additional buds; C: Plantlet with rootage; D: Plantlet after transplanting

维普资讯 http://www.cqvip.com

快 (图 1C)，并且数量较多，生根率为 100%，所以 1/4MS + NAA 0.5 mg/L 为最佳的生根培养基。

2.4 无菌苗的驯化与移栽

试管苗能顺利完成从试管内到外界的适应过程，移栽前的炼苗非常重要。炼苗能提高试管苗对外界环境的抵抗力，使它从一个完全封闭的无菌环境中进入完全开放的环境的中间过渡，适宜的炼苗过程，能增强植株的抵抗力，对移栽后的成活至关重要。本实验在移栽前将封口膜打开 1~2 d 后才将其移栽到灭菌的蛭石中，这样让其慢慢适应外面的环境条件。移栽的前两周尽量保持较高的空气湿度。

试管苗移栽到基质中，15 d 左右就有新叶长出 (图 1D)，生根的夏枯草组培苗经过炼苗后移栽后成活率为 93%。

3 讨论

在组织培养过程中，经常会出现污染、外植体褐化和玻璃化现象。对于本实验所用的植物材料夏枯草来说，以顶芽和茎节为外植体时，褐化和玻璃化现象较少出现，但在培养的外植体周围 (在受伤处) 会出现红色的物质，这种物质扩散较慢。具体原因还需进一步研究。

在植物组织培养过程中，常采用通过外植体诱导出愈伤组织，然后分化出芽丛的方法，但是这种方法容易出现变异，可能会造成药用植物优良性状的遗失，并且培养周期较长。以顶芽或带腋芽的茎段为外植体直接诱导芽丛的方法在植物组织培养中应用也较广泛，原因是通过这个途径获得的组培苗遗传稳定性较好，快繁周期短，诱导方法较简单，在组织培养过程中不必对愈伤组织与芽丛进行单独的诱导，减少了培养过程中劳动量，同时也降低了成本 (钟士传和杜启兰, 2002, 北方园艺, (1): 54)。从本实验结果可知，夏枯草的茎节比较适合进行芽丛的诱导，因此建议在进行夏枯草快速繁殖工厂化生产时选用茎节作为外植体较好。

参考文献

Gu X.J., Li Y.B., Li P., Qian S.H, and Zhang J.F., 2007, Triterpenoid saponins from the spikes of *Prunella vulgaris*, Helv. Chim. Acta, 90(1): 72-78

Harput U.S., Saracoglu I., and Ogihara Y., 2006, Effects of two *Prunella* species on lymphocyte proliferation and nitric oxide production, Phytother. Res., 20(2): 157-159

Meng Z.M., and He L.W., 1995, Study on chemical constituents of *Prunella vulgaris* L., Zhongguo Yike Daxue Xuebao (Journal of China Pharmaceutical University), 26(6): 329 (孟正木, 何立文, 1995, 夏枯草化学成分研究, 中国药科大学学报, 26(6): 329)

Pacheco P., Sierra J., Schmeda-Hirschmann G., Potter C.W., Jones B.M., and Moshref M., 1993, Antiviral activity of chilean medicinal plant extracts, Phytother. Res., 7(6): 415-418

Noel Ellis博士

Noel Ellis博士，现在英国Colney，Norwich, John Innes中心作物遗传所工作。

1976 年毕业于爱丁堡大学生物科学 (分子生物学) 系，获得理学学士；1979 年毕业于爱丁堡大学，微卫星 DNA 组织方向，获得博士学位；1979 年至今，在 John Innes 中心工作；2000-2001 年，担任应用遗传学部门负责人；2001 年至今，作物遗传学联合负责人。其研究方向：豌豆叶片发展；JIC 豌豆遗传图谱；豌豆的经典遗传图谱；相对遗传图谱；豌豆的遗传多样性。

2007年3月23-27日Ellis博士应邀出席了“第二届植物分子育种国际学术研讨会(The 2nd International Conference of Plant Molecular Breeding)”，并且做了题为“**Comparative genomics for gene isolation in legumes**”的报告。其相应的报告摘要刊登在《分子植物育种》2007年第2期第152-153页。