

金线兰一次性成苗及设施栽培关键技术研究

周晨¹, 谷巍^{1,2,*}, 顾正国³, 谷宇琛¹, 田荣¹, 王帆¹, 陈子匀¹

¹南京中医药大学药学院, 南京210023

²江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京210023

³江苏道诚生物科技有限公司, 江苏盐城224100

摘要: 以金线兰(*Anoectochilus roxburghii*)带节茎段为外植体, 进行一次性成苗技术研究, 将所得组培苗在不同基质上进行人工栽培试验, 以5月龄金线兰株高、叶片数、茎粗、根数等外部形态及槲皮素、山柰酚和异鼠李素等3种黄酮类成分含量为指标优选最适设施栽培基质, 最后于江苏盐城进行金线兰设施栽培应用验证。结果表明: MS+0.5 mg·L⁻¹茶乙酸+0.15%活性炭+0.6%琼脂+3%蔗糖+100 g·L⁻¹香蕉泥为金线兰最佳一次性成苗培养基, 添加0.24 g·L⁻¹多菌灵可显著降低染菌率。TOPSIS (逼近理想解排序法)分析结果显示, 树皮(粗细等量混和)是组培苗移栽的最适基质, 其成活率高且长势良好, 单株鲜重3.319 g, 折干率达18.83%; 泥炭土+树皮+珍珠岩(体积比5:4:1)次之。采用上述栽培基质, 金线兰在江苏盐城设施栽培中生长良好。本实验为江苏地区的金线兰种苗快速生产及工厂化设施栽培生产提供参考依据。

关键词: 金线兰; 一次性成苗; 江苏; 设施栽培; 含量测定

金线兰(*Anoectochilus roxburghii*), 其干燥全草名为金线莲(邵玲等2018), 是我国珍稀名贵中药材, 民间有“药王”“金草”“仙草”“鸟人参”等美誉, 我国以福建、浙江为主产区。其味甘, 性平, 具有凉血祛风、除湿解毒、消肿止痛等功效, 对糖尿病(Zhang等2015)、急性慢性肝炎(王建栋等2015)、肿瘤(Yu等2017)等均具有显著疗效, 在医疗美容领域亦具有极大开发价值(许璟瑾等2017)。研究表明, 黄酮类成分是金线兰的主要活性成分, 被认为是金线兰及其提取物药效的主要评价指标(刘露等2018)。金线兰叶形优美独特, 兼具观赏和药用价值, 但由于其种子细小、胚胎发育不完全, 在自然环境中萌发率极低(董贝等2018), 人工分根或扦插繁殖系数低且耗时长, 加之环境破坏和过度采挖等多种因素导致其野生资源锐减。传统组培繁殖需要不定芽诱导、增殖、生根壮苗等过程(童虹宇等2018; 江爱明和周向宇2017; 周丽等2015), 操作繁琐, 染菌率高。随着大健康时代的到来, 金线兰市场需求不断扩大, 而目前金线兰产区集中在福建、浙江、广西等地, 尚未见江苏地区设施生产的相关报道。

一次性成苗技术已在半夏(*Pinellia ternata*) (温琳2017)、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*) (琚淑明2016)等植物组织培养中有相关报道, 其具有

成苗时间短、成本低等优点。本文对金线兰一次性成苗技术进行研究, 利用该技术所得成品苗进行人工栽培实验, 筛选出江苏地区最适移栽基质, 并对所得金线兰药材进行质量评价; 最后, 将该体系运用于江苏实际生产中, 以期金线兰工厂化大量快速生产提供良好的种苗和技术方案参考, 为缓解金线兰野生资源枯竭和后期综合开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料于2017年9月采自福建省莆田市, 由福建中医药大学药学院杨成梓教授鉴定为兰科植物金线兰[*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.], 种苗移栽于南京中医药大学人工气候室内。留样凭证保存于南京中医药大学中药资源与鉴定实验室。

收稿 2019-04-22 修定 2019-08-27

资助 中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2017]66号)和江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目(ZDXM-3-24)。

致谢 福建省农业科学院陈菁瑛研究员和福建中医药大学药学院杨成梓教授。

* 通讯作者(guwei9926@126.com)。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体灭菌

选取健壮、无病虫害的金线兰植株, 自来水下冲洗干净, 剪去叶片; 浸泡于低浓度洗衣粉溶液中洗涤约3 min, 流动自来水冲洗3次后置于超净工作台上, 用体积比75%乙醇振荡30 s, 无菌水冲洗3次, 1.0 g·L⁻¹氯化汞(每100 mL滴加2滴吐温20)浸泡消毒8 min, 无菌水冲洗5次, 置于灭菌滤纸上吸干水分备用。

1.2.2 接种诱导

以MS为基本培养基, 添加3%蔗糖(分析纯, 陇西化工股份有限公司)、100 g·L⁻¹香蕉泥(实验室自制)、0.6%琼脂粉(分析纯, 上海惠兴生化试剂有限公司)和0.15%活性炭(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), pH调至5.8, 加入不同浓度比的植物生长调节剂(表1), 加热溶解后高温灭菌。将消毒好备用的金线兰茎段在超净工作台上切成段, 每段1.5~2 cm且均带一个节, 基部向下竖直插入培养基中。每个处理接种3瓶, 每瓶接种约25个外植体。

1.2.3 高效无菌体系建立

在普通独立实验室超净工作台上, 将金线兰带节茎段接种在优选出的加入不同浓度(0、0.24、0.48、0.80 g·L⁻¹)多菌灵(80%可湿性粉剂, 英国邦农得农用化学集团公司)的最适一次性成苗培养基中, 每个处理接种3瓶, 每瓶约25个外植体。

1.2.4 培养条件

光照时间随时间推移递增: 接种后第一周暗

培养, 第二至第四周8 h·d⁻¹, 第二个月10 h·d⁻¹, 第三个月起12 h·d⁻¹; 光照强度: 约22.5 μmol·m⁻²·s⁻¹; 温度(24±2)°C。

1.2.5 炼苗与移栽

将最适一次性成苗培养基培养4个月后的组培苗转移至人工气候室内。5~7 d后打开组培瓶瓶盖, 继续炼苗5~7 d后取出, 在流动的自来水下将根部附着的残留培养基冲洗干净, 放入多菌灵1 000倍液中浸泡10 min, 置于干净竹筐中沥干备用。

选择生长基本一致、洗净消毒的组培苗按株行距3 cm×3 cm移栽入用经高锰酸钾消毒3~5 d后的基质中, 移栽时以基质盖没过基部一节为宜。基质选择泥炭(粒径10~30 mm, 丹麦品氏)、花生壳(腐熟)、珍珠岩(粒径3~6 mm)、树皮(粒径10~25 mm)和蛭石(粒径2~5 mm), 均购自德州兴艺达花卉植料有限公司, 按不同体积比混和(表2)。每种处理栽培100株。使用遮阳网控制光照强度约37.5 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度(25±3)°C, 相对湿度约75%。根据基质湿度适时喷水, 每2周用氨基酸冲施肥和2 g·L⁻¹ KH₂PO₄施肥一次。

1.2.6 金线兰黄酮含量测定

采收不同栽培基质上栽培5个月后的金线兰, 流水快速冲洗干净, 擦干表面水分, 60°C烘干, 粉碎, 过3号筛(孔径0.355 mm, 江苏省南京市维晨筛网厂)备用。

色谱条件: YMC-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梯度洗脱程序为: 0 min, 乙腈-0.2%磷酸水溶液(体积比25:75); 20 min, 乙腈-0.2%磷酸水溶液(体积比48:52)。柱温30°C, 流速1.0 mL·min⁻¹, 进样量10 μL。

对照品溶液制备: 精密称取槲皮素对照品2.20 mg、山柰酚对照品2.02 mg、异鼠李素对照品2.26 mg, 分别置10 mL容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 分别制得对照品储备液I (0.220 mg·mL⁻¹槲皮素)、储备液II (0.202 mg·mL⁻¹山柰酚)、储备液III (0.226 mg·mL⁻¹异鼠李素)。

供试品溶液的制备: 取金线兰粉末0.5 g, 精密称定, 置60 mL烧瓶中, 精密加入甲醇-25%盐酸(体积比4:1) 25 mL, 称定质量, 加热回流60 min, 放冷, 补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过0.22 μm微孔滤膜即得。

表1 不同植物生长调节剂浓度配比

Table1 Different concentrations of plant growth regulators

编号	植物生长调节剂浓度 mg·L ⁻¹	
	萘乙酸	6-苄氨基嘌呤
A1	0.2	0
A2	0.2	1
A3	0.2	2
A4	0.5	0
A5	0.5	1
A6	0.5	2
A7	1.0	0
A8	1.0	1
A9	1.0	2

表2 金线兰栽培基质
Table 2 Different cultivation substrates of *A. roxburghii*

序号	泥炭	花生壳	珍珠岩	树皮	蛭石	体积比
B1	+	+	-	-	-	2:1
B2	+	+	-	-	-	1:1
B3	+	+	-	-	-	1:2
B4	+	-	+	-	-	5:1
B5	+	-	-	+	+	7:2:1
B6	+	+	+	-	-	8:1:1
B7	+	-	+	+	-	5:1:4
B8	-	-	-	-	+	-
B9	-	-	+	-	-	-
B10	-	-	-	+	-	粗细1:1

“+”即本组加入对应基质,“-”则不加入对应基质。

线性关系考察: 精密吸取对照品储备液I 0.5 mL、储备液II 0.05 mL、储备液III 0.5 mL, 置于5 mL容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成每1 mL分别含槲皮素22.0 μg、山柰酚2.02 μg、异鼠李素22.6 μg的混和对照品溶液, 进样1、2、5、10、13、16、20 μL, 分别测定峰面积。

1.2.7 江苏地区适应性移栽

将最适一次性成苗培养基培养4个月后的金线兰组培苗转移至江苏道诚生物科技有限公司中药材种植基地设施连栋大棚内。按第1.2.5节所述步骤进行炼苗, 并在筛选出的最适栽培基质中进行适应性移栽。设施栽培5个月后按第1.2.6节所述对三种黄酮类指标成分进行含量测定。

2 实验结果

2.1 不同植物生长调节剂浓度比对茎段生长的影响

以带节茎段为外植体接种到不同植物生长调节剂浓度比的培养基中。观察发现, A4培养基生长情况最好, 外植体接种15 d后节上长出白色嫩芽, 后逐渐变成黄绿色, 同时部分节上长出白色簇状根毛。每个外植体着生1个芽, 25 d后芽长至1~1.5 cm, 逐渐展开成叶。1个月后, 部分芽展开成叶, 簇状根毛处逐渐长出根, 并不断向培养基中生长; 2个月时, 初步形成金线兰小苗, 每株1~2片小叶, 可在培养瓶底部见到白色根尖; 3个月时, 小苗进一步生长, 每株2~3片叶, 且叶片变大, 每株可见2~3个节, 节间进一步伸长, 培养基底部可见数量较

多、较细的根, 根上密布有白色根毛; 4个月时, 叶片增多变大、茎节变粗, 根较粗且多而较长, 达到出瓶移栽要求(图1)。

不同植物生长调节剂浓度比对外植体生长的影响具有较明显的差异(表3)。对其外部形态考察, 发现其中株高和节数差异不明显, 不同处理下平均株高为7.31 cm, 平均节数为3.45; A4培养基生根数最多, A1培养基生根最少, 分别为3.40和2.28根; 培养4个月后苗重最大的是A4, 为1.40 g; A4萌发率最高为91.3%, 最低为A2, 最大差异为10.0%。

2.2 不同浓度抑菌剂对金线兰外植体的影响

不同浓度多菌灵对染菌率及金线兰成苗具有显著影响。结果显示(图2), 多菌灵浓度在0.24 g·L⁻¹时, 即可以有效降低细菌及真菌污染; 而当多菌灵浓度高于0.48 g·L⁻¹时, 会抑制外植体的正常生长, 产生毒害作用, 其出成苗率低于62.1%。

2.3 不同基质对金线兰组培苗的影响

将组培苗在不同栽培基质移栽培养5个月后, 观察其外部形态(图3-A), 测量植株的株高、叶片数、叶长、叶宽、茎粗、节数、根数、根长、鲜重、干重等10项外部生态指标(表4), 采用逼近理想解排序法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)分析, 对不同基质栽培的金线兰进行综合评价(表5)。TOPSIS分析的基本思想为计算现实中的每个样品距离最佳方案和最差方案的距离, 利用理想解的相对接近度作为综合评估的标准, 其样品*i*到正理想解和负理想

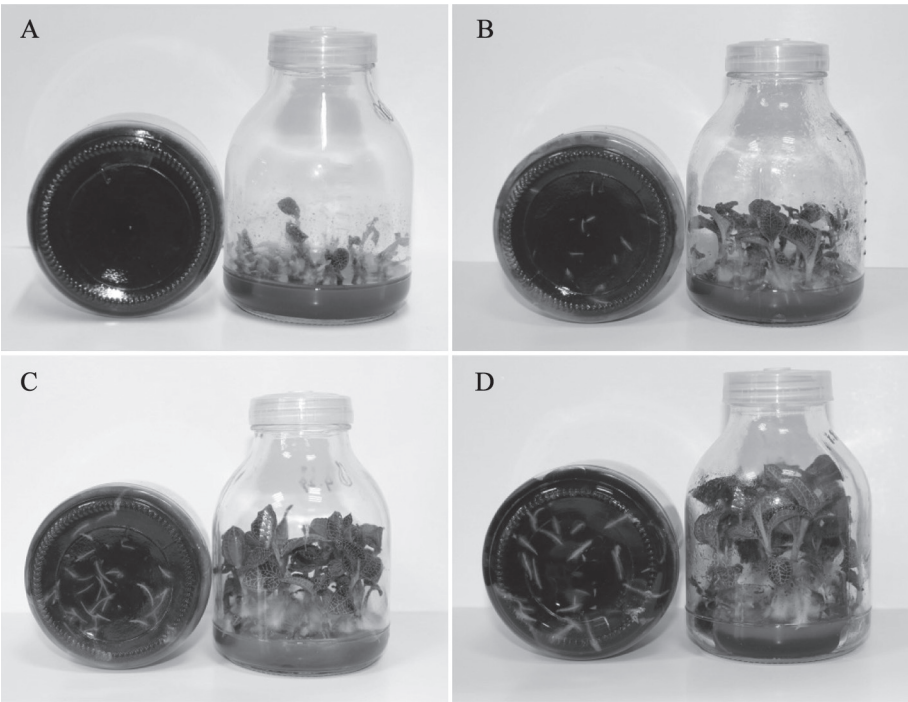


图1 金线兰不同培养基一次性成苗培养情况
Fig.1 One-step seedling culture in different media of *A. roxburghii*
A: 苗龄一个月; B: 苗龄两个月; C: 苗龄三个月; D: 苗龄四个月。

表3 不同培养基对成苗的影响
Table 3 Effects of different media on seedling formation

编号	株高/cm	节数	生根数	根长/cm	苗重/g	萌芽率/%
A1	7.01	3.44	2.28	2.19	1.21	83.2
A2	6.97	3.24	2.44	1.88	1.08	81.3
A3	7.31	3.40	2.56	2.07	1.24	82.6
A4	7.83	3.60	3.40	2.65	1.40	91.3
A5	6.98	3.28	3.28	2.48	1.14	87.5
A6	7.00	3.72	3.04	2.37	1.08	88.1
A7	7.12	3.36	2.48	2.25	1.30	83.6
A8	7.81	3.52	2.72	2.30	1.29	83.9
A9	7.73	3.48	2.68	2.20	1.25	85.3

解之间的欧氏距离分别为 D_i^+ 和 D_i^- , C_i 即某样品对于理想解的相对接近度。按照 C_i 值将不同基质排序, C_i 值越大, 表明综合适宜度越高。

由表4可知, 金线兰株高和叶片数与基质种类相关性不明显, 不同基质栽培5个月后, 金线兰株高均在10 cm左右, 叶片数大多为6~7片, 其中, B10号基质移栽5个月后金线兰长势最好(图3), 叶片大而舒展, 茎节多而粗壮, 根较多且长, 鲜重和干重

分别达3.319和0.625 g; B7栽培的金线兰外部形态次佳。

运用DPS软件进行TOPSIS分析, 根据 C_i 值排序为: B10>B7>B3>B2>B4>B1>B6>B5>B8>B9; C_i 值越大, 说明金线兰综合评价质量越好。其中B10(粗细树皮等量混和) C_i 值为0.787 4, 最有利于金线兰生长; B7 (泥炭+珍珠岩+树皮)次之。最大 C_i 差异达77.25%, 可较好区分不同基质对金线兰的适宜度。

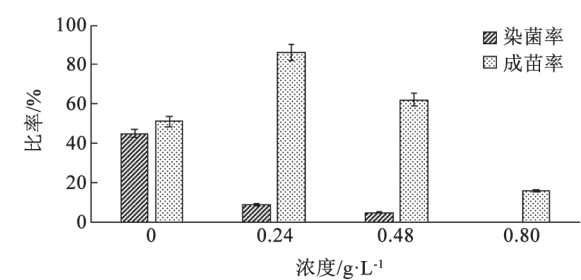


图2 不同浓度多菌灵对金线兰的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of carbendazim on *A. roxburghii*

将金线兰移栽至不同栽培基质培养5个月后, 对其成活率和折干率进行考察(图4)。不同基质对

金线兰的成活率有较大影响, B10和B7成活率较高, 分别为91.4%和90.0%; B9成活率最低, 仅为60.0%, 最大差异达31.4%。

2.4 不同栽培基质对金线兰黄酮类成分的影响

2.4.1 线性关系考察

以浓度为横坐标(*X*)、峰面积为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线, 分别得回归方程: 槲皮素 $Y=29\,967X-27\,928$, $r=0.999\,9$ ($n=5$); 山柰酚 $Y=44\,449X-4\,667$, $r=0.999\,9$ ($n=5$); 异鼠李素 $Y=29\,784X-26\,807$, $r=0.999\,9$ ($n=5$)。结果表明, 槲皮素在22.0~440.0 ng、山柰酚在2.02~40.4 ng、异鼠李素在22.6~452.0 ng 进样量范围内呈良好线性关系。

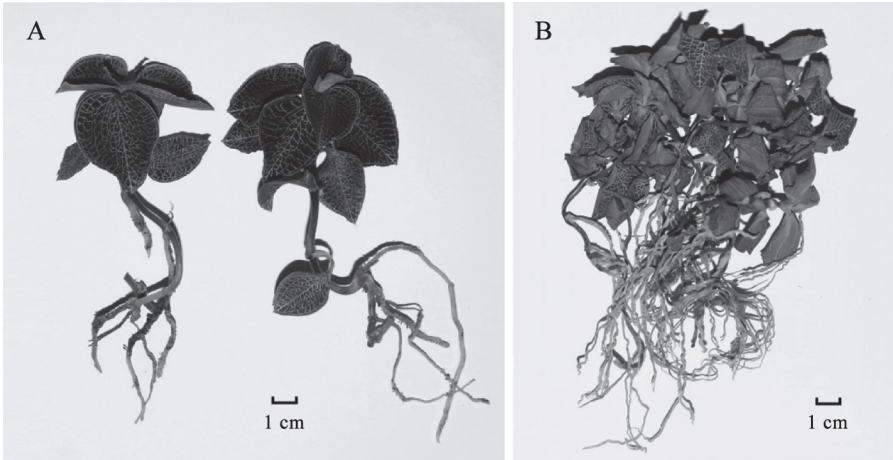


图3 移栽5个月后的金线兰
Fig.3 *A. roxburghii* after transplanting for 5 months
A: 鲜品; B: 干品。

表4 不同基质对五月龄金线兰移栽苗的影响

Table 4 *A. roxburghii* after transplanting in different substrates for 5 months

基质	株高/cm	叶数	叶长/cm	叶宽/cm	茎粗/mm	节数	根数	根长/cm	鲜重/g	干重/g
B1	10.649	6.583	2.973	2.253	2.887	5.333	4.333	5.329	2.958	0.503
B2	11.185	6.900	2.979	2.234	2.909	5.500	4.400	5.985	2.880	0.519
B3	10.495	6.636	3.324	2.471	3.130	4.909	4.000	6.066	3.065	0.503
B4	9.979	6.667	3.054	2.391	2.877	5.500	4.500	6.089	2.936	0.478
B5	10.570	7.500	2.879	2.166	2.811	5.583	3.583	5.677	2.637	0.408
B6	9.975	6.818	2.885	2.161	2.959	5.545	4.273	4.919	2.519	0.492
B7	11.636	7.583	3.027	2.353	2.988	5.417	4.583	6.114	3.241	0.563
B8	10.033	6.600	2.791	2.200	2.627	4.933	4.200	5.031	2.440	0.389
B9	9.264	5.500	2.752	2.206	2.463	5.100	4.400	5.116	2.100	0.322
B10	11.538	7.250	3.199	2.438	3.016	5.583	4.083	6.631	3.319	0.625

表5 不同栽培基质对金线兰生长影响TOPSIS综合评价结果

Table 5 TOPSIS results of the effects of different substrates on the growth of <i>A. roxburghii</i>					
基质	D_i^+	D_i^-	C_i	排序	C_i 差异/%
B1	0.194 3	0.197 1	0.503 6	6	36.04
B2	0.165 4	0.233 6	0.585 5	4	25.64
B3	0.174 6	0.247 9	0.586 7	3	25.49
B4	0.192 4	0.220 6	0.534 1	5	32.17
B5	0.280 1	0.163 1	0.368 0	8	53.26
B6	0.233 6	0.198 8	0.459 8	7	41.61
B7	0.119 2	0.288 9	0.707 9	2	10.10
B8	0.281 6	0.109 2	0.279 4	9	64.52
B9	0.357 9	0.078 1	0.179 1	10	77.25
B10	0.088 8	0.328 9	0.787 4	1	0

2.4.2 不同栽培基质中金线兰黄酮类成分测定

采收五月龄金线兰, 干燥(图3-B), 置研钵中粉碎。按第1.2.6节所述方法制备供试品溶液, 分别进样10 μ L。槲皮素、山柰酚、异鼠李素保留时间分别为12.4、16.5和17.1 min, 与对照品相一致(图5)。根据所测定峰面积, 计算槲皮素、山柰酚、异鼠李素质量分数(表6)。10种基质栽培5个月的金线兰槲皮素含量为0.089 7%~0.135 8%, 山柰酚含量为0.005 7%~0.010 5%, 异鼠李素为0.077 3%~0.111 9%,

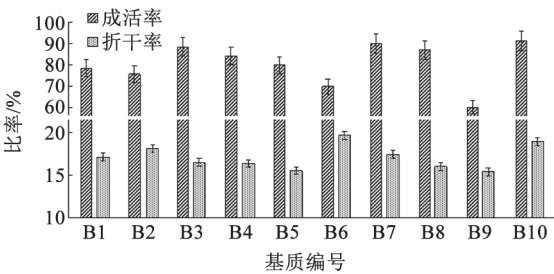


图4 不同基质栽培下金线兰的成活率及折干率
Fig.4 Survival rate and drying rate of *A. roxburghii* in different substrate cultivation

其中B10基质所栽培的金线兰槲皮素和异鼠李素含量最高, 分别为0.1358%和0.111 9%, 总含量达0.257 8%; B1和B7基质次之, 总含量分别为0.233 5%和0.233 2%。

2.5 江苏地区适应性移栽

将一次性成苗培养基培养4个月后的金线兰组培苗放置于江苏道诚生物科技有限公司中药材种植基地设施连栋大棚内炼苗后, 移栽至B10基质中。经5个月设施栽培后, 金线兰生长良好, 采收并干燥后测定其三种黄酮类成分, 结果显示, 江苏盐城5月龄设施栽培金线兰槲皮素、山柰酚、异鼠李素质量分数分别为0.069 0%、0.007 30%、0.099 2%。

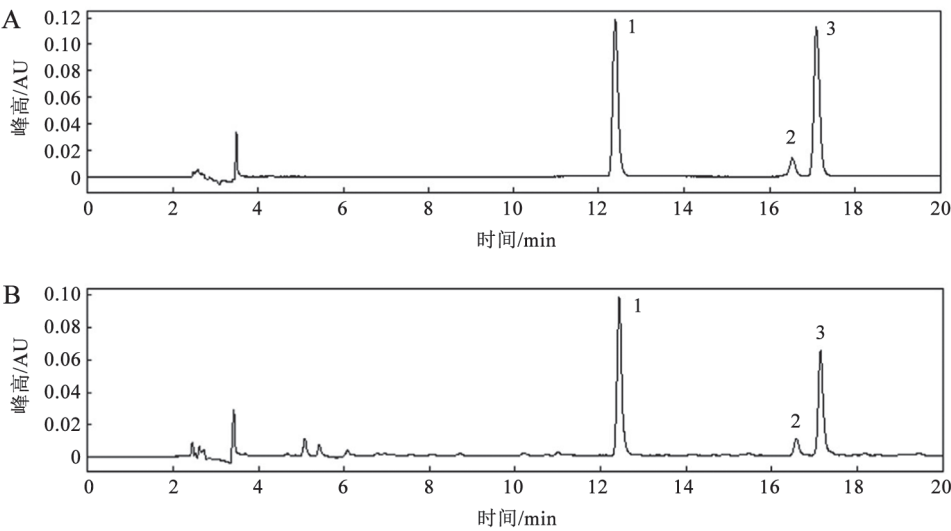


图5 对照品(A)及金线兰样品(B)色谱图
Fig.5 Standard substances (A) and samples (B) of *A. roxburghii*
1: 槲皮素; 2: 山柰酚; 3: 异鼠李素。

表6 不同基质栽培金线兰黄酮类成分测定
Table 6 Determination of flavonoids in *A. roxburghii* in different substrate cultivation

编号	质量分数			%
	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	
S1	0.126 5	0.010 5	0.096 5	0.233 5
S2	0.089 7	0.008 0	0.077 3	0.175 0
S3	0.105 4	0.008 9	0.088 9	0.203 1
S4	0.102 3	0.007 3	0.084 2	0.193 8
S5	0.118 1	0.009 6	0.098 6	0.226 3
S6	0.098 8	0.006 6	0.085 6	0.190 9
S7	0.125 1	0.009 8	0.098 2	0.233 2
S8	0.095 5	0.009 5	0.094 4	0.199 4
S9	0.108 9	0.005 7	0.090 9	0.205 5
S10	0.135 8	0.010 1	0.111 9	0.257 8

3 讨论

3.1 金线兰最佳组培培养基的选择

萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)是常用的植物生长调节剂,可诱导不定根的形成,提高植物扦插的成活率(邓小梅等2018)。实验结果表明,低浓度NAA (0.2 mg·L⁻¹)对生根促进作用微弱,形成的根较短,不利于后期移栽;而当浓度过高(1.0 mg·L⁻¹)时,会导致少部分金线兰种苗出现畸形叶。6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)是植物组织培养中常用的细胞分裂素,可以促进芽的形成,常与NAA等生长素配合使用。但是实验结果表明,6-BA对于金线兰芽的形成促进作用不明显,金线兰茎段在节上萌发出1个芽,逐渐发育为一个完整植株。在外部光照、温度等条件一致的条件下,金线兰组培苗株高差异不明显,推测金线兰组培过程中,株高与植物生长调节剂的比例并无特定关系,而与光照相关。香蕉在铁皮石斛(成丹等2018)、小白及(*Bletilla formosana*) (苏钰和付传明2016)、短距槽舌兰(*Holcoglossum flavescens*) (周丽等2014)等兰科植物的组织培养中已有相关应用,其对pH具有较大的缓冲作用,对植株的发育有促进作用。

在金线兰一次性成苗培养基中加入0.48 g·L⁻¹以上多菌灵,发现其对金线兰的生长产生抑制作

用,部分外植体长出芽后逐渐停止生长。普通实验室条件下0.24 g·L⁻¹多菌灵即可有效降低染菌率。相关文献报道,通过外部紫外灯照射结合臭氧灭菌,亦可降低染菌率(梁东超等2018)。因此,金线兰最佳培养基选择MS培养基+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.15%活性炭+0.6%琼脂+3%蔗糖+100 g·L⁻¹香蕉泥,在环境质量不高的情况下,加入0.24 g·L⁻¹多菌灵降低染菌率。

3.2 金线兰设施栽培条件的选择

树皮已在铁皮石斛(麻永红等2017)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*) (张佳霞等2017)等植物的无土栽培中得到广泛应用,粗树皮透气性好,但颗粒之间空隙过大,保水性差;细树皮保水性较好,但透气性差;粗细树皮等比例混和使基质具有较好的保水性和透气性,其成活率为91.4%,折干率为18.8%,适宜金线兰植株的生长。

泥炭是目前世界公认的最佳无土栽培基质之一,pH为5.5~6.5,呈微酸性,保水能力强,在植物栽培中有广泛应用(赵富群等2017),但其透气性较差。珍珠岩的加入虽在一定程度上增加了其透气性,但由于珍珠岩颗粒较小,透气性依旧不佳,导致金线兰并不能达到最佳生长状态。同时加入树皮和珍珠岩增加了泥炭中的大小空隙,保水性和透气性俱佳,提高了金线兰的成活率和质量。珍珠岩呈小颗粒状,透气性佳,广泛应用于土壤改造,但其保水性差,营养成分少,其成活率仅为60.0%,故在金线兰栽培中不适宜单独使用。因此,金线兰最佳栽培基质选择为树皮(粗细1:1)或泥炭土+树皮+珍珠岩(5:4:1)。

金线兰为喜阴植物,设施栽培阶段生长环境温度整体应控制在25℃左右,不宜超过28℃。本实验在江苏3月栽培,温度较为适宜。栽培过程中,环境温度低于20℃时,利用大棚进行保温;夏季高温、光照强烈时,适当增加遮阳网密度,及时开启排风机与水帘进行降温。

3.3 金线兰中黄酮含量测定

研究表明,黄酮类成分 是金线兰的主要活性成分之一,可作为金线兰质量控制的指标(杨彬彬等2018;李瑞姿等2017;刘知远等2015)。本研究运用高效液相色谱技术对不同栽培基质上5月龄金线

兰中槲皮素、山柰酚和异鼠李素等3种黄酮类成分进行测定,其质量分数分别为0.089 7%~0.135 8%、0.005 7%~0.010 5%和0.077 3%~0.111 9%。槲皮素和异鼠李素含量均达到相关文献报道的林下仿生态种植金线兰含量,但山柰酚含量略低(沈廷明等2018)。通过适应性移栽发现,设施栽培所得到的金线兰三种黄酮含量均略低于人工气候室栽培样品,推测可能是由于设施栽培条件下温湿度没有人工气候室环境温湿度控制精确所致,因此,在设施栽培中控制环境条件对金线兰生长具有重要意义。通过不同方法诱导金线兰活性成分的积累有待进一步的研究。

参考文献(References)

- Cheng D, Nie T, Li C (2018). A preliminary study on the seedling technique of *Dendrobium officinale*. *Mod Hortic*, 5 (9): 16–17 (in Chinese) [成丹, 聂天骄, 李成慧(2018). 铁皮石斛一次成苗技术初探. *现代园艺*, 5 (9): 16–17]
- Deng X, Wu Q, Li R, et al (2018). Research progress on *in vitro* micropropagation of Fagaceae plants. *J Nanjing For Univ-Nat Sci*, 42 (4): 171–180 (in Chinese with English abstract) [邓小梅, 吴乔娜, 李蕊萍等(2018). 壳斗科植物组织培养研究进展. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 42 (4): 171–180]
- Dong B, Yuan Y, Lu X, et al (2018). Research progress on tissue culture techniques of *Anoectochilus roxburghii*. *Shaanxi J Agr Sci*, 64 (3): 93–96 (in Chinese) [董贝, 袁园园, 卢绪鹏等(2018). 金线莲组织培养技术研究进展. *陕西农业科学*, 64 (3): 93–96]
- Jiang AM, Zhou XY (2017). Tissue culture and rapid propagation of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J Hanjiang Norm Univ*, 37 (3): 17–21 (in Chinese with English abstract) [江爱明, 周向宇(2017). 金线莲组织培养与快速繁殖. *汉江师范学院学报*, 37 (3): 17–21]
- Ju SM, Zhu WL, Wang WL, et al (2016). Direct regeneration of seedling from stem fragments of *Dendrobium candidum*. *J Gansu Agr Univ*, 51 (1): 45–48 (in Chinese with English abstract) [琚淑明, 朱伟玲, 王伟亮等(2016). 铁皮石斛茎段离体培养一次成苗技术研究. *甘肃农业大学学报*, 51 (1): 45–48]
- Li RZ, Lin J, Wang XX, et al (2017). Nontargeted metabolomic analysis of *Anoectochilus roxburghii* at different cultivation stages. *Chin J Chin Mat Med*, 42 (23): 4624–4630 (in Chinese with English abstract) [李瑞姿, 林军, 汪霞霞等(2017). 基于不同栽培阶段金线莲的代谢组学分析. *中国中药杂志*, 42 (23): 4624–4630]
- Liang DC, Liang JM, Yun T (2018). Research progress of chemical prevention and control of pollution in potato tissue culture. *J Anhui Agr Sci*, 46 (9): 34–35 (in Chinese with English abstract) [梁东超, 梁俊梅, 云庭(2018). 马铃薯组织培养污染化学防控研究进展. *安徽农业科学*, 46 (9): 34–35]
- Liu L, Sun LL, Pei YL, et al (2018). Effects of different drying methods on the activity of total flavonoids of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) *in vitro*. *Guangdong Agr Sci*, 45 (3): 107–113 (in Chinese with English abstract) [刘露, 孙连立, 裴运林等(2018). 不同干燥方式对金线莲黄酮体外活性影响的研究. *广东农业科学*, 45 (3): 107–113]
- Liu ZY, Shen TM, Wu ZY (2015). Simultaneous determination of quercetin, kaempferide, and isorhamnetin in *Anoectochilus roxburghii* from Fujian by RP-HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*, 46 (3): 432–434 (in Chinese with English abstract) [刘知远, 沈廷明, 吴仲玉(2015). RP-HPLC法同时测定福建产金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的量. *中草药*, 46 (3): 432–434]
- Ma Y, Xiao Y, Yang Z, et al (2017). Effects of the different media on growth of *Dendrobium officinale* seedling. *J Cent South Univ For Technol*, 37 (7): 73–77 (in Chinese with English abstract) [麻永红, 肖玉, 杨曾奖等(2017). 不同基质对铁皮石斛苗期生长特性的影响. *中南林业科技大学学报*, 37 (7): 73–77]
- Shao L, Liang L, Duan ZF, et al (2018). Responses of spring planting *Anoectochilus roxburghii* in screenhouse to different growth light intensities in Guangdong province. *J Chin Med Mat*, 41 (1): 1–7 (in Chinese with English abstract) [邵玲, 梁廉, 段志芳等(2018). 广东金线莲大棚春季种植对不同生长光强的响应. *中药材*, 41 (1): 1–7]
- Shen TM, Huang CQ, Liu ZY, et al (2018). Study on quality standard of imitation ecological planting *Anoectochilus roxburghii* under forest covering. *Chin Tradit Herb Drugs*, 49 (2): 450–454 (in Chinese with English abstract) [沈廷明, 黄春情, 刘知远等(2018). 林下仿生态种植金线莲的质量标准研究. *中草药*, 49 (2): 450–454]
- Su T, Fu C (2016). Asepsis sowing and technology of rapid culture and propagation for *Bletilla formosana*. *J Yunnan Agr Univ*, 30 (2): 245–249 (in Chinese with English abstract) [苏钦, 付传明(2016). 小白及无菌播种组培快繁技术研究. *云南农业大学学报(自然科学)*, 30 (2): 245–249]
- Tong HY, Zhou XX, Li J, et al (2018). Tissue culture and rapid propagation of rare and endangered *Tangtsinia nanchuanica*. *Plant Physiol J*, 54 (11): 1681–1686 (in Chinese with English abstract) [童虹宇, 周小雪, 李娟等(2018). 珍稀濒危植物金佛山兰的组培快繁. *植物生理学报*, 54 (11): 1681–1686]
- Wang JD, Wang HZ, Zhang AL, et al (2015). Recent advances in kinsenoside studies. *Chin Hosp Phar J*, 35 (19): 1795–

- 1798, 1802 (in Chinese with English abstract) [王建栋, 王红珍, 张爱莲等(2015). 金线莲苷研究进展. 中国医院药学杂志, 35 (19): 1795–1798, 1802]
- Wen L (2017). Establishment of tissue culture system and genetic transformation system of *Pinellia ternata* (dissertation). Taiyuan: Shanxi University, 10–12 (in Chinese with English abstract) [温琳(2017). 半夏组织培养体系和遗传转化体系的建立(学位论文). 太原: 山西大学, 10–12]
- Xu J, Zhang W, Wang J, et al (2017). The active component screening of *Anoectochilus roxburghii* and the functional study on inhibition of melanogenesis in zebrafish. *Hereditas Beijing*, 39 (12): 1178–1187 (in Chinese with English abstract) [许璟瑾, 张文娟, 王静怡等(2017). 金线莲抑制斑马鱼黑色素形成的活性组分筛选及机理研究. 遗传, 39 (12): 1178–1187]
- Yang BB, Zhang LR, Li H (2018). Determination of four flavonoids in *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl by HPLC. *Strait Pharm J*, 30 (2): 24–27 (in Chinese with English abstract) [杨彬彬, 张丽蓉, 李红(2018). HPLC法测定金线莲中4种黄酮类化合物. 海峡药学, 30 (2): 24–27]
- Yu X, Lin S, Zhang J, et al (2017). Purification of polysaccharide from artificially cultivated *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. by high-speed counter current chromatography and its antitumor activity. *J Sep Sci*, 40 (22): 4338–4346
- Zhang JG, Liu Q, Liu ZL, et al (2015). Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *J Ethnopharm*, 164: 180–185
- Zhang JX, Zhang KB, Wei XL, et al (2017). Study on application of slow-release fertilizer in the bark substrate cultivation of *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. F. *Mod Agr Sci Technol*, (22): 112–113, 119 (in Chinese with English abstract) [张佳霞, 张锴滨, 韦小莲等(2017). 缓释肥在蝴蝶兰树皮基质栽培中的应用研究. 现代农业科技, (22): 112–113, 119]
- Zhao FQ, Yin Q, Hong WJ, et al (2017). Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron moultmainense*. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1666–1672 (in Chinese with English abstract) [赵富群, 尹茜, 洪文君等(2017). 毛棉杜鹃的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 53 (9): 1666–1672]
- Zhou L, Long L, Wang Y, et al (2015). Asymbiotic seed germination and rapid seedling regeneration of *Anoectochilus xingrenensis*. *Plant Physiol J*, 51 (11): 2025–2030 (in Chinese with English abstract) [周丽, 隆林, 王苑等(2015). 兴仁金线兰种子非共生萌发特性与快繁育苗. 植物生理学报, 51 (11): 2025–2030]
- Zhou L, Xu ZH, Tan CM (2014). Domestication cultivation and rapid propagation of *Holcoglossum flavescens*. *Plant Physiol J*, 50 (6): 792–796 (in Chinese with English abstract) [周丽, 徐正海, 谭成敏(2014). 短距槽舌兰的驯化栽培与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (6): 792–796]

Study on one-step seedling formation of *Anoectochilus roxburghii* and its key facility cultivation techniques

ZHOU Chen¹, GU Wei^{1,2,*}, GU Zheng-Guo³, GU Yu-Chen¹, TIAN Rong¹, WANG Fan¹, CHEN Zi-Yun¹

¹School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

²Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

³Jiangsu Daocheng Biological Technology Co., Ltd., Yancheng, Jiangsu 224100, China

Abstract: Cultivating seedlings by using stem segments as explants, the seedlings were transplanted in different substrates for artificial cultivation experiments. The best cultivation substrate was determined based on the external morphological indexes such as plant length, number of leaves, stem diameter, number of roots, and the content of flavonoids such as quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Finally, the cultivation application of *Anoectochilus roxburghii* was carried out in Yancheng, Jiangsu. The results show that MS + 0.5 mg·L⁻¹ naphthylacetic acid (NAA) + 0.15% active carbon (AC) + 0.6% agar + 3% sucrose + 100 g·L⁻¹ banana was the best one-step seedling culture medium for *A. roxburghii*. Adding 0.24 g·L⁻¹ carbendazim can reduce the infection rate significantly. Bark was the most suitable cultivation substrate for transplanting seedlings. It had a high survival rate and grew well. The fresh weight was 3.319 g per plant, and the drying rate was 18.83%. Peat soil + bark + perlite (5:4:1, V/V/V) followed. *A. roxburghii* cultivated in Yancheng grew well. It can provide reference for the rapid production of *A. roxburghii* seedlings and the cultivation of factory facilities in Jiangsu province.

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; one-step culture; Jiangsu; facility cultivation; content determination

Received 2019-04-22 Accepted 2019-08-27

This work was supported by the Chinese Medicine Public Health Service Subsidy Special “National Chinese Medicine Resources Census Project” (Caishe[2017]66), and Jiangsu Traditional Chinese Medicine Resource Industrialization Process Collaborative Innovation Center Project (ZDXM-3-24).

*Corresponding author (guwei9926@126.com).