

连续浇灌腐植酸对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的影响

张汉琪¹, 戴伟锋¹, 李宝才¹, 李进学^{2,①}, 张 救^{1,①}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 云南 瑞丽 678600)

Effect of continuous irrigation with humic acids on total flavonoids content in leaves of *Citrus×limon* ‘Yunning 1’

ZHANG Hanqi¹, DAI Weifeng¹, LI Baocai¹, LI Jinxue^{2,①}, ZHANG Mi^{1,①} (1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Institute of Tropical and Subtropical Cash Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Ruili 678600, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2021, 30(6): 64-66

Abstract: *Citrus×limon* ‘Yunning 1’ planted in Ruili of Yunnan was continuously irrigated with 0.1, 0.5, and 1.0 g · L⁻¹ fulvic acid and sodium humate respectively, and total flavonoids contents in leaves of *C.×limon* ‘Yunning 1’ in different months were compared. The results show that compared with the blank group, fulvic acid and sodium humate treatment groups have promotion effects on total flavonoids contents in leaves of *C.×limon* ‘Yunning 1’ in general, in which, total flavonoids contents in leaves of *C.×limon* ‘Yunning 1’ in 0.1 and 0.5 g · L⁻¹ fulvic acid treatment groups in February 2021 and 0.5 and 1.0 g · L⁻¹ sodium humate treatment groups in October 2020 and February 2021 are significantly ($P<0.05$) or extremely significantly ($P<0.01$) elevated. It is suggested that irrigation with 1.0 g · L⁻¹ sodium humate has a relatively good promotion effect on total flavonoids content in leaves of *C.×limon* ‘Yunning 1’ in the early stage of treatment, while the promotion effect of irrigation with 0.5 g · L⁻¹ fulvic acid is relatively good in the later stage of treatment.

关键词: 柠檬品种‘云柠1号’; 叶; 总黄酮; 黄腐酸; 腐植酸钠

Key words: *Citrus×limon* ‘Yunning 1’; leaf; total flavonoids; fulvic acid; sodium humate

中图分类号: Q946.8; S606⁺.2; S666.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2021)06-0064-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2021.06.08

腐植酸(humic acid, HA)是植物残体经过微生物转化以及一系列地球化学作用后形成的一类有机弱酸混合物^[1-2],根据相对分子质量与溶解性大小,分为黄腐酸、棕腐酸和黑腐酸^[3]。腐植酸具有改良土壤、增效肥料、刺激作物生长、增强作物抗逆性和改善作物品质的作用^[4],被广泛应用于农作物种植等领域。

柠檬[*Citrus×limon* (Linn.) Osbeck]具有药食两用性^[5],其品质鉴定指标除了营养成分外,还包括功能成分^[6]。柠檬果实和叶中丰富的挥发油和黄酮类成分是柠檬发挥药用功能的主要活性物质,也是柠檬加工品的主要原料^[7-8]。作者所在课题组的前期研究发现,施用腐植酸叶面肥可提高柠檬叶中挥发油含量及抗氧化活性^[9]。为进一步研究腐植酸类物质对柠檬叶中黄酮类成分的影响及优化施用浓度,本研究选择不同质量浓度黄腐酸和腐植酸钠连续6个月浇灌柠檬改良品种‘云柠1号’(‘Yunning 1’),对不同处理组叶中总黄酮含量进

行比较和分析,评价腐植酸施用效果并得到较优施用浓度,期为腐植酸的科学应用和柠檬的品质提升提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为柠檬品种‘尤力克’(‘Eureka’)的改良品种‘云柠1号’,种植于云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所柠檬基地(瑞丽站),株龄3~4 a,株高0.9~1.5 m,种植于直径50 cm、高50 cm的帆布花盆中,每盆1株,以瑞丽当地酸性土为基质,每盆装4/5盆基质。实验在温室大棚中进行。

参照文献[10]中的方法,从褐煤(产自四川德阳)中提取黄腐酸和腐植酸钠,黄腐酸中水分、灰分、总腐植酸、游离腐植酸和水溶性腐植酸的含量分别为4.05%、19.01%、20.11%、19.39%和19.05%,pH 3.88;腐植酸钠中水分、灰分、总腐植酸、

收稿日期: 2021-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21466018)

作者简介: 张汉琪(1994—),男,山西大同人,硕士研究生,主要从事腐植酸类物质对柠檬生长影响方面的研究。

①通信作者 E-mail: ljxue810@163.com; midylee@126.com

引用格式: 张汉琪, 戴伟锋, 李宝才, 等. 连续浇灌腐植酸对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(6): 64-66.

游离腐植酸和水溶性腐植酸的含量分别为2.61%、25.35%、59.72%、57.58%和58.68%,pH 7.62。

1.2 方法

1.2.1 实验设计与样品采集 2020年10月开始,于每月1日对同一批‘云柠1号’幼树连续6个月浇灌黄腐酸或腐植酸钠溶液,浇灌质量浓度分别为0.1、0.5和1.0 g·L⁻¹,每个质量浓度设置6组重复,每组10株,每次每株浇灌4 L。空白组浇灌等体积自来水。每月15日或16日采集空白组和处理组植株四周新梢上2~3周新生叶,每组采集40~50 g,采集后立即用自封袋分装并用干冰保存。

1.2.2 样品处理 每组称取新鲜柠檬叶30~35 g装入纸袋中,于50℃烘干至恒质量,称量后用200 mL体积分数80%甲醇于25℃、25 kHz超声提取45 min,抽滤,重复提取1次,合并2次滤液,用旋转蒸发器于43℃浓缩至适量体积,然后用体积分数80%甲醇定容至100 mL,即样品溶液,于4℃保存、备用。

1.2.3 芦丁标准品溶液配制 准确称取芦丁标准品10 mg(合肥博美生物公司,纯度大于等于98%),加入适量体积分数80%甲醇溶解后定容至50 mL,于4℃保存、备用。

1.2.4 芦丁标准曲线建立 准确吸取0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0和8.0 mL芦丁标准品溶液,用NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH显色^[11],然后用体积分数80%甲醇定容至25 mL,于波长510 nm处测定吸光度(A₅₁₀)。以A₅₁₀值为纵坐标(y)、芦丁含量为横坐标(x),绘制标准曲线,线性回归方程为y=11.037x+0.003,芦丁含量的线性范围为0.000~0.064 mg·mL⁻¹,R²值为0.999 3。

1.2.5 总黄酮含量的测定 准确吸取样品溶液1.0 mL,按上述方法测定A₅₁₀值,重复测定3次,结果取平均值,根据芦丁标准曲线,计算总黄酮含量。

1.2.6 方法学考察

1.2.6.1 显色稳定性考察 随机抽取3个样品溶液,准确吸取1.0 mL,采用芦丁标准曲线建立方法,每隔15 min测定A₅₁₀值,重复测定3次,结果取均值,连续测2 h。结果显示:所有样品

的A₅₁₀值均有所下降,但RSD值均小于2%,表明本方法的显色稳定性良好。

1.2.6.2 精密度的考察 随机抽取3个样品溶液,采用芦丁标准曲线建立方法,分别于同一天的7:00、13:00和19:00测定,每个样品重复测定3次。另取1个样品溶液,采用芦丁标准曲线建立方法,于每日13:00测定A₅₁₀值,每日重复测定3次,连续测定3 d。结果显示:日内与日间的A₅₁₀值均有所下降,但RSD值均小于2%,表明本方法精密度的良好。

1.2.6.3 加样回收率测定 准确吸取某一样品溶液1.0 mL,测定总黄酮含量,再取同一样品溶液1.0 mL,分别加入芦丁标准品溶液1.0、2.0和3.0 mL,后续操作同芦丁标准曲线建立方法,计算加样回收率。结果显示:样品的平均加样回收率为100.53%,RSD值为0.53%,表明本方法加样回收率良好。

1.3 数据分析

采用EXCEL 2019软件对实验数据进行分析和处理,采用SPSS 22.0统计分析软件进行差异显著性分析(LSD)。

2 结果和分析

连续浇灌不同质量浓度黄腐酸和腐植酸钠对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的影响见表1。由表1可见:连续浇灌6个月,0.1和0.5 g·L⁻¹黄腐酸处理组以及0.1、0.5和1.0 g·L⁻¹腐植酸钠处理组的总黄酮含量总体上高于空白组,其中,2021年2月的0.1和0.5 g·L⁻¹黄腐酸处理组以及2020年10月和2021年2月的0.5和1.0 g·L⁻¹腐植酸钠处理组的总黄酮含量较空白组显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)升高。而2020年11月的1.0 g·L⁻¹黄腐酸处理组和0.1 g·L⁻¹腐植酸钠处理组以及2020年12月的0.5和1.0 g·L⁻¹黄腐酸处理组的总黄酮含量与空白组相比明显下降。综合比较结果显示:处理前期,1.0 g·L⁻¹腐植酸钠处理组对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的提升作用较好;处理后期,0.5 g·L⁻¹黄腐酸处理组对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的提升作用较好。

表1 连续浇灌不同质量浓度黄腐酸和腐植酸钠对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量的影响(n=6)¹⁾

Table 1 Effect of continuous irrigation with different mass concentrations of fulvic acid and sodium humate on total flavonoids contents in leaves of *Citrus×limon* ‘Yunning 1’ (n=6)¹⁾

处理组 Treatment group	不同月份(YYYY-MM)的总黄酮含量/% Total flavonoids contents in different months (YYYY-MM)					
	2020-10	2020-11	2020-12	2021-01	2021-02	2021-03
空白组 The blank group	5.39±0.95	6.12±0.31	6.00±0.24	3.20±0.36	3.36±0.34	3.74±0.62
0.1 g·L ⁻¹ FA	6.52±0.84	5.94±0.76	6.06±0.77	3.63±0.12	6.77±0.62**	4.33±0.65
0.5 g·L ⁻¹ FA	6.47±0.85	6.54±0.87	4.90±0.23	3.88±0.75	7.03±0.91**	4.56±0.45
1.0 g·L ⁻¹ FA	5.89±0.97	5.38±0.12	4.97±0.26	3.22±0.50	3.82±0.64	3.56±0.26
0.1 g·L ⁻¹ SH	6.61±0.91	5.64±0.57	7.51±0.68	3.84±0.36	5.40±0.90	5.38±0.28
0.5 g·L ⁻¹ SH	7.25±0.68*	6.18±0.52	6.48±0.49	3.50±0.53	6.45±0.69**	4.00±0.45
1.0 g·L ⁻¹ SH	7.55±0.85*	6.22±0.45	6.49±0.38	4.85±0.86	5.57±0.72*	3.82±0.28

¹⁾ FA: 黄腐酸 Fulvic acid; SH: 腐植酸钠 Sodium humate. *, **: 分别表示处理组与空白组间存在显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)差异。Indicating the significant (P<0.05) and extremely significant (P<0.01) differences between the treatment group and the blank group, respectively.

3 讨论和结论

挥发油和黄酮类物质是柠檬中颇具应用价值的次生代谢产物。次生代谢产物是植物在长期进化过程中与环境相互作用的结果,但次生代谢产物在植物中含量很低,提高植物中次生代谢产物含量对该类成分的应用具有现实意义。本研究通过比较连续6个月浇灌不同质量浓度黄腐酸或腐植酸钠后柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量发现,与空白组相比,浇灌黄腐酸和腐植酸钠总体上对柠檬品种‘云柠1号’叶中总黄酮含量具有一定的提升作用,但不同月份及不同质量浓度黄腐酸和腐植酸钠处理组的作用水平存在差异,表现为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 腐植酸钠处理组在处理前期的提升作用较好,而 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄腐酸处理组处理后期的提升作用较好。

参考文献:

- [1] MYNENI S C B, BROWN J T, MARTINEZ G A, et al. Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils[J]. *Science*, 1999, 286(5443): 1335-1337.
- [2] 李 双. 腐植酸: 为开启生物刺激素第5次农业生产资料变革大门举旗定标[J]. *腐植酸*, 2021(1): 7-13.
- [3] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 1.
- [4] 张 瑜, 王若楠, 邱小倩, 等. 腐植酸对植物生长的促进作用[J]. *腐植酸*, 2018(2): 5-9.
- [5] SINGH N, YARLA N S, SIDDIQI N J, et al. Features, pharmacological chemistry, molecular mechanism and health benefits of lemon[J]. *Medicinal Chemistry*, 2021, 17(3): 187-202.
- [6] 刘 浩, 周闲容, 于晓娜, 等. 作物种质资源品质性状鉴定评价现状与展望[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(1): 215-221.
- [7] NOSHAD M, BEHBAHANI B A, JOOYANDEH H, et al. Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing *Citrus limon* essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions [J]. *Food Science and Nutrition*, 2021, 9: 1625-1639.
- [8] 李冬梅. 中国柠檬产业竞争力及其影响因素分析[D]. 武汉: 华中农业大学经济管理学院, 2014: 18-33.
- [9] 何孝英, 朱春华, 李进学, 等. 腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油的含量、化学成分组成及抗氧化活性的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2017, 26(4): 54-59, 83.
- [10] 昆明理工大学, 寻甸县云峰化工有限责任公司, 任万云, 等. 褐煤氧化降解生产腐植酸及其盐的方法: 200810233669.X [P]. 2009-05-06.
- [11] 王丽丽, 林清霞, 宋振硕, 等. 分光光度法测定茶叶中总黄酮含量[J]. *茶叶学报*, 2021, 62(1): 1-6.
- [12] 段传人, 王伯初, 徐世荣. 环境应力对植物次生代谢产物形成的作用[J]. *重庆大学学报*, 2003, 26(10): 67-71.
- (责任编辑: 张明霞)
-
- (上接第9页 Continued from page 9)
- [19] AMELINE-TORREGROSA C, WANG B B, O'BLENESS M S, et al. Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(1): 5-21.
- [20] WANG Y, TANG H, DEBARRY J D, et al. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [21] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] ZHANG Y M, CHEN M, SUN L, et al. Genome-wide identification and evolutionary analysis of NBS-LRR genes from *Dioscorea rotundata*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 484.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] KALYAANAMOORTHY S, MINH B Q, WONG T K F, et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(6): 587-589.
- [25] MINH B Q, NGUYEN M A T, VON HAESLER A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(5): 1188-1195.
- [26] SHAO Z Q, ZHANG Y M, HANG Y Y, et al. Long-term evolution of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes: understanding gained from and beyond the legume family[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(1): 217-234.
- [27] CAMBIAGNO D A, TORRES J R, ALVAREZ M E. Convergent epigenetic mechanisms avoid constitutive expression of immune receptor gene subsets [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 703667.
- (责任编辑: 佟金凤)