

氮素处理对不同种质菘蓝叶氨基酸、总黄酮与矿质元素的影响*

唐晓清** 吕婷婷 施晟璐 王雨 杨月 王康才

南京农业大学中药材研究所 南京 210095

摘要 菘蓝 *Isatis indigotica* 为十字花科的药用植物, 其叶入药为大青叶, 为了解菘蓝的氮营养生理, 以5份种质菘蓝 (S1-S5) 为材料, 采用田间小区试验, 设置7个处理, 不施氮 (CK)、硝态氮 (NO_3^- -N, T1)、铵态氮 (NH_4^+ -N, T2)、 NH_4^+ -N/ NO_3^- -N = 75/25 (T3)、 NH_4^+ -N/ NO_3^- -N = 50/50 (T4)、 NH_4^+ -N/ NO_3^- -N = 25/75 (T5) 和酰胺态氮 (100% $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ -N, T6), 研究不同氮素处理对不同种质菘蓝叶的氨基酸、总黄酮和矿质元素含量的影响. 结果显示, 不同种质菘蓝叶的游离氨基酸、总黄酮与矿质元素对不同氮素处理的响应存在较大的差异. 其中T3处理的S3的总游离氨基酸含量增加幅度 (54.03%) 最大, T6处理不利于游离氨基酸的积累; T1处理的S2的总黄酮含量增加幅度 (28.11%) 最大, T3处理能提高4份种质S1-S3与S5的总黄酮含量; T3处理有利于5份种质的5种必需元素P、K、Ca、Mg和Cu的吸收, 但不利于Ni元素的吸收. 综上, NH_4^+ -N与 NO_3^- -N (75/25) 配合施用能有效促进菘蓝对矿质元素的吸收, 同时也能提高其总黄酮和游离氨基酸的含量; 研究结果可为优质的大青叶药材生产提供参考依据. (表3 参26)

关键词 大青叶; 菘蓝; 氮素处理; 氨基酸; 总黄酮; 矿质元素

CLC S567.906.2

Effect of nitrogen treatment on amino acids, total flavonoids, and mineral elements of *Isatis indigotica* from different germplasms*

TANG Xiaoping **, LÜ Tingting, SHI Shenglu, WANG Yu, YANG Yue & WANG Kangcai

Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract The dried leaves of *Isatis indigotica* of the family Cruciferae were used to be Folium isatidis. To determine the nitrogen nutrition physiology of *I. indigotica*, a field experiment was conducted including 5 *I. indigotica* germplasms (S1-S5) to analyze the contents of the free amino acids, total flavonoids, and mineral elements in the leaves using the following seven nitrogen treatments with three replicates: nitrogen control (CK), nitrate nitrogen (NO_3^- -N; T1), ammonium nitrogen (NH_4^+ -N; T2), NH_4^+ -N/ NO_3^- -N (75/25; T3), NH_4^+ -N/ NO_3^- -N (50/50; T4), NH_4^+ -N/ NO_3^- -N (25/75; T5), and amide nitrogen ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; T6). The responses of different nitrogen treatments on the contents of the free amino acids, total flavonoids, and mineral elements in *I. indigotica* leaves were different from each other, in which the total free amino acid content (54.03%) of S3 by T3 was the highest, but the T6 treatment was not conducive to the accumulation of amino acids. The total flavonoid content (28.11%) of S2 by T1 was the greatest, but T3 could increase the total flavonoid contents of S1-S3 and S5. T3 could promote the absorption of P, K, Ca, Mg, and Cu in *I. indigotica* leaves, but it was not conducive to the Ni absorption. In summary, the ammonium and nitrate nitrogen combined application (NH_4^+ -N/ NO_3^- -N, 75/25) could effectively promote the absorption of mineral elements, and could increase the contents of free amino acids and total flavonoids, which could provide a reference basis for the production of good-quality Folium Isatidis.

Keywords Folium Isatidis; *Isatis indigotica*; nitrogen treatment; amid acids; total flavonoids; mineral element

十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶入药为大青叶^[1], 具有清热解毒、凉血消斑的功效, 用于温邪入营、高热神昏、发斑发疹、黄疸热痢等症. 临床上用于治疗各种病毒性流行感冒、流行性腮腺炎和病毒性肝炎等疾病. 大青叶含有靛蓝、靛玉红等吲哚类化合物、喹唑酮类、黄酮类化合物^[2]. 随着对大青叶化学成分与药理研究的深入, 其基原

植物菘蓝栽培生产也日益受到重视, 而提高大青叶的品质也成为人们关注的焦点. 近年来在菘蓝的栽培生产中, 有关氮素营养对其生长、光合及体内吲哚类生物碱影响的研究日益增多^[3-6], 不同氮素形态及比例能影响菘蓝的生长及靛玉红等成分的积累. 不同产地来源菘蓝的干物质积累、光合作用对氮形态及其比例的响应有明显差异^[7], 根内的游离氨基酸、蛋白等氮类化合物也有不同的响应^[8]. 此外适宜氮素形态及其配比能促进苗期菘蓝叶中矿质元素的吸收^[9], 而氮素营养对收获入药时大青叶的氨基酸、总黄酮与矿质元素含

收稿日期 Received: 2016-03-29 接受日期 Accepted: 2016-06-13

*国家自然科学基金项目 (31171486) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171486)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xqtang@njau.edu.cn)

量影响尚未见报道. 为此以不同种质菘蓝为材料, 采用田间小区试验, 考察不同形态氮素及组合处理下不同种质菘蓝叶内的氨基酸、总黄酮与矿质元素含量, 探究适合不同种质菘蓝叶的氨基酸、矿质元素与总黄酮积累的最佳氮素形态及组合, 旨在为菘蓝栽培的氮营养生理研究奠定基础, 为提供优质的青叶药材生产提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

分别来自于安徽亳州、甘肃张掖、安徽阜阳、山西运城和陕西商洛的5份种质材料(S1-S5), 经南京农业大学中药材研究所王康才教授鉴定为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的角果(生产中称种子).

1.2 试验设计

试验地设在南京农业大学江浦农场园艺站试验基地, 试验田为壤土, 肥力中等(0-30 cm土层有机质0.91 g/kg、全氮0.15%、碱解氮136 mg/kg、有效磷19.50 mg/kg、速效磷0.16 mg/kg、pH 6.35). 小区间距40 cm, 沟深30 cm, 四周设1 m保护行, 每个小区面积为3.75 m² (1.5 m × 2.5 m), 于2013年5月21日进行条播, 行株距25 cm × 7 cm, 共设105个小区. 试验采用3种不同氮素形态, 铵态氮(NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)和酰胺态氮配比, 单因素完全随机处理. 在磷、钾肥用量相同的基础上, 施氮量一致(氮肥用量为675 kg/hm² [6])的条件下, 设计7个处理[CK, 不施氮; T1, 100% NO₃⁻-N; T2, 100% NH₄⁺-N; T3, NH₄⁺-N/NO₃⁻-N (75/25); T4, NH₄⁺-N/NO₃⁻-N (50/50); T5, NH₄⁺-N/NO₃⁻-N (25/75); T6, 100% CO(NH₂)₂-N], 其中CK为对照, 每处理3个重复. 所有处理正常施磷、钾肥, 分2次处理, 第1次追肥于7月下旬, 第2次追肥于9月下旬, 在行间挖浅沟浇入处理液, 然后覆土, 每次用量相同, 按KH₂PO₄ 150 kg/hm²水平施用, 随机区组排列, 常规田间管理. 处理液中铵态氮由硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]提供; 硝态氮由硝酸钾(KNO₃)提供; 酰胺态氮由纯脲[CO(NH₂)₂]提供. 所有处理液中加入硝化抑制剂双氰胺(DCD), 用量为处理液中纯氮含量的0.4%, 磷、钾肥由磷酸二氢钾(KH₂PO₄)提供, 所用试剂均为分析纯. 2013年10月21日采样, 每个小区随机采取10株, 清洗干净, 置于干燥箱内105 °C杀青15 min, 后调至60 °C继续烘干至恒重, 粉碎过60目筛备用.

1.3 测定项目及方法

1.3.1 矿质元素测定 采用微波消解法对样品进行消解. 所有器皿均在10%硝酸洗液中浸泡24 h后用去离子水冲洗干净, 烘干、备用. 精确称取样品0.10 g置于内插管中, 加入2 mL HNO₃, 轻轻摇动使混合均匀, 盖好内插管盖, 放入微波消解罐中消解30 min, 消解完毕, 冷却后置通风橱中开罐, 用去离子水将消解液定容至25 mL容量瓶中, 摇匀备用. 同时配制空白溶液.

采用ICP-MS法测定. 各种元素的标准储备液均采用光谱纯金属或氧化物单独配制而成, 以去离子水逐级稀释配制混合标准溶液系列. 首先采用ICP-MS法测定标准溶液中各元素含量, 绘制标准工作曲线, 然后依次测定大青叶中各元素含量. Optimal 2100DV电感耦合等离子体发射光谱仪的工作参数为射频功率1 300 W, 辅助气流量0.2 L/min, 等离子

体气流量15 L/min, 雾化气压力0.8 L/min, 蠕动泵转速1.5 mL/min.

1.3.2 总黄酮测定 以芦丁为标准品, 采用比色法进行测定. ① 芦丁标准溶液的配制: 精密称取120 °C干燥至恒重的芦丁12.5 mg, 用70%乙醇定容至25 mL容量瓶作为标准溶液. ② 标准曲线的制作: 准确量取0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL芦丁标准溶液, 放入25 mL容量瓶中, 分别加入2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0 mL的70%乙醇溶液, 再加入5%亚硝酸钠溶液0.5 mL, 静置6 min, 加入10%硝酸铝溶液0.5 mL, 摇匀, 静置6 min, 加入4 mL的4%氢氧化钠溶液, 用70%乙醇定容, 摇匀后静置15 min, 在波长510 nm处测定其吸光度值. 以不加标准溶液的相应溶液作为空白对照, 以芦丁标准液含量为纵坐标(y), 吸光度值为横坐标(x)作标准曲线, 得回归方程: $y = 1.137x - 0.0015$, $R^2 = 0.9999$ ($N = 3$). ③ 大青叶样品溶液的制备: 准确称量供试样品粉末0.1000 g, 加入70%乙醇5 mL, 70 °C水浴回流30 min, 从回流液中精确量取1 mL于10 mL容量瓶中, 用70%乙醇定容, 之后从中取2 mL于25 mL容量瓶中, 自“再加入5%亚硝酸钠溶液0.5 mL”起依据标准曲线法测定. 由回归方程计算出大青叶中总黄酮含量.

1.4 游离氨基酸测定

采用茚三酮比色法进行测定游离氨基酸总量^[10].

1.5 数据处理

采用Excel 2007和SPSS 17.0统计软件对试验数据进行处理与分析, 以Duncan's新复根差法比较不同处理间的差异显著性.

2 结果与分析

2.1 氮素处理对不同种质菘蓝叶氨基酸总量的影响

CK中5份种质的游离氨基酸总量差异较大(表1), 其中S1的氨基酸总量显著高于其他种质($P < 0.05$), S2、S3与S4间无显著性差异($P > 0.05$). 比较不同处理间的差异得到: T1处理的S3、S4与S5的含量高于相应CK, S3比相应CK高42.46%, T3处理的S1、S3与S5的游离氨基酸总量为各种质的最高值, 其中S3比相应CK高54.03%; 可见铵态氮与铵硝混合施用(铵硝比75:25)后有利于S1、S3与S5这3份大青叶内游离氨基酸总量的积累. 而T6处理下S1-S5的氨基酸总量均低于相应CK, 说明单纯施用尿素(酰胺态氮)不利于菘蓝叶的游离氨基酸积累, 可见不同种质菘蓝叶内游离氨基酸总量对不同形态氮素及其组合的响应有明显差异. 比较不同种质间的差异得到: S1与S3在T3处理, S2、S4与S5均在T2处理下为各处理间的最大值, 分别高于相应CK2.74% (4.87)、40.25% (3.31)、54.03% (4.39)、24.66% (2.73)和37.56% (2.71); 可见不同形态氮素处理后对不同种质菘蓝叶的游离氨基酸积累有不同的效应.

2.2 氮素处理对不同种质菘蓝叶总黄酮含量的影响

CK中5份种质菘蓝叶的总黄酮含量存在明显的差异(表2), 其中S3的总黄酮含量最高; 氮素处理对不同种质的菘蓝叶中总黄酮含量的影响有较大差异, 不同处理间比较结果显示, 与相应CK相比, T1、T6和T3这3个处理均提高了4份种质菘蓝叶的总黄酮含量. T1与T3处理后的S1的总黄酮含量高于相应CK, 但与CK间无显著性差异($P > 0.05$), 其余处理

表1 不同氮素处理对苕蓝叶游离氨基酸总量的影响 (w/mg g⁻¹, N = 3)
Table 1 Effects of different nitrogen treatments on amino acids in leaves of *Isatis indigotica*

处理 Treatment	对照 Control (CK)	硝态氮100% NO ₃ ⁻ -N 100% (T1)	铵态氮100% NH ₄ ⁺ -N 100% (T2)	铵态氮/硝态氮 (75/25) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (75/25) (T3)	铵态氮/硝态氮 (50/50) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (50/50) (T4)	铵态氮/硝态氮 (25/75) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (25/75) (T5)	酰胺态氮100% CO(NH ₂) ₂ -N 100% (T6)
安徽亳州 Bozhou, Anhui (S1)	4.74 ± 0.13 ^a	3.14 ± 0.04 ^b	4.47 ± 0.06 ^a	4.87 ± 0.05 ^a	4.56 ± 0.08 ^a	3.96 ± 0.05 ^c	2.16 ± 0.13 ^b
甘肃张掖 Zhangye, Gansu (S2)	2.36 ± 0.08 ^c	2.12 ± 0.03 ^d	3.31 ± 0.03 ^b	2.27 ± 0.09 ^d	2.08 ± 0.01 ^e	1.82 ± 0.09 ^d	2.00 ± 0.09 ^c
安徽阜阳 Fuyang, Anhui (S3)	2.85 ± 0.07 ^b	4.06 ± 0.09 ^b	2.59 ± 0.16 ^d	4.39 ± 0.12 ^b	2.52 ± 0.11 ^{ab}	2.29 ± 0.04 ^f	2.35 ± 0.12 ^{cd}
山西运城 Yuncheng, Shanxi (S4)	2.19 ± 0.06 ^{bcd}	2.32 ± 0.10 ^b	2.73 ± 0.08 ^c	2.12 ± 0.11 ^d	2.29 ± 0.08 ^{bc}	2.04 ± 0.11 ^d	1.65 ± 0.06 ^d
陕西商洛 Shangluo, Shaanxi (S5)	1.97 ± 0.08 ^d	2.17 ± 0.10 ^{cd}	2.71 ± 0.04 ^c	2.49 ± 0.10 ^b	1.97 ± 0.07 ^{cd}	2.22 ± 0.06 ^c	1.20 ± 0.04 ^e

同列数值后不同上标字母表示种质间差异显著 ($P < 0.05$) ; 同行数值后不同下标字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) 。
The different superscript letters within rows mean significant differences among areas at 0.05 level. The different subscript letters within lines mean significant differences among treatments at 0.05 level.

表2 不同氮素处理对苕蓝叶总黄酮含量的影响 (w/mg g⁻¹, N = 3)
Table 2 Effects of different nitrogen treatments on total flavonoids in leaves of *Isatis indigotica*

处理 Treatment	对照 Control (CK)	硝态氮100% NO ₃ ⁻ -N 100% (T1)	铵态氮100% NH ₄ ⁺ -N 100% (T2)	铵态氮/硝态氮 (75/25) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (75/25) (T3)	铵态氮/硝态氮 (50/50) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (50/50) (T4)	铵态氮/硝态氮 (25/75) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (25/75) (T5)	酰胺态氮100% CO(NH ₂) ₂ -N 100% (T6)
安徽亳州 Bozhou, Anhui (S1)	45.58 ± 1.23 ^{ab}	46.02 ± 2.06 ^b	41.18 ± 0.97 ^{bc}	49.07 ± 2.01 ^a	42.87 ± 1.04 ^{bc}	42.64 ± 1.71 ^{bc}	44.08 ± 1.75 ^{bc}
甘肃张掖 Zhangye, Gansu (S2)	41.62 ± 2.10 ^b	53.32 ± 0.27 ^a	44.93 ± 1.62 ^a	45.86 ± 0.35 ^b	40.96 ± 0.80 ^b	45.68 ± 1.40 ^b	51.88 ± 0.46 ^a
安徽阜阳 Fuyang, Anhui (S3)	46.24 ± 0.84 ^a	44.79 ± 0.27 ^{bc}	42.81 ± 1.14 ^{ab}	51.25 ± 1.54 ^a	40.57 ± 2.53 ^b	33.47 ± 0.48 ^d	49.64 ± 1.38 ^a
山西运城 Yuncheng, Shanxi (S4)	43.94 ± 0.13 ^{ab}	44.26 ± 0.88 ^{bc}	39.01 ± 1.04 ^d	40.02 ± 0.93 ^d	46.72 ± 1.06 ^a	40.99 ± 0.58 ^{bc}	46.01 ± 1.16 ^{ab}
陕西商洛 Shangluo, Shaanxi (S5)	41.69 ± 1.22 ^{bcd}	42.52 ± 0.87 ^c	40.46 ± 1.05 ^{cd}	46.11 ± 1.06 ^b	41.96 ± 0.93 ^{bd}	39.84 ± 1.27 ^d	50.43 ± 0.74 ^a

同列数值后不同上标字母表示种质间差异显著 ($P < 0.05$) ; 同行数值后不同下标字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) 。
The different superscript letters within rows mean significant differences among areas at 0.05 level. The different subscript letters within lines mean significant differences among treatments at 0.05 level.

低于CK, 且T2处理的S1显著低于CK ($P < 0.05$) ; 除T4处理后S2低于CK外, 其余处理后的S2总黄酮含量均显著高于CK ($P < 0.05$) ; T3与T6处理后的S3显著高于CK, 其余处理均低于CK; T1、T4与T6处理后的S4的含量均高于CK, 其中T4与T6均显著高于CK ($P < 0.05$) ; T1、T3、T4与T6这4个处理后的S5高于CK, 其中T3与T6显著高于CK ($P < 0.05$) 。T1-T6各处理下的总黄酮含量最大值分别高于相应CK28.11% (S2: 53.32) 、7.95% (S2: 44.93) 、10.83% (S3: 51.25) 、6.33% (S4: 46.72) 、9.75% (S2: 45.68和24.65% (S2: 51.88) 。不同种质之间比较结果显示, T1、T2、T5与T6处理后的S2, T3处理后的S3, T4处理后的S4均为各相应处理下5份种质间总黄酮含量最高, 且S2在4个处理下均显著高于S2的CK ($P < 0.05$) , S1-S5的总黄酮含量最大值分别高于相应CK7.66% (T3: 49.07) 、28.11% (T1: 53.32) 、10.83% (T3: 51.25) 、6.33% (T4: 46.72) 和20.96% (T6: 50.43) ; 可见不同种质本身的总黄酮含量存在一定的差异, 氮素处理后对不同种质苕蓝叶总黄酮的积累有不同的效应。

2.3 氮素处理对不同种质苕蓝叶矿质元素含量的影响

2.3.1 大量元素磷、钾、钙与镁 CK中S5的钾、钙与镁含量最高 (表3) , S4的磷含量最高。比较不同处理间的差异, 除T2与T5处理的S3的磷含量低于相应CK之外, 所有处理的磷含量均高于相应CK; 除T5处理的S5的钾含量低于CK, 所有处理的钾含量均高于相应CK; 除T1处理的S2, T2处理的S1与S3-S5, T4处理的S1, T5处理的S3和T6处理的S5的钙含量低于CK外, 其余处理的所有样品的钙含量均高于相应CK, T1处理的S2, T2、T5与T6处理的S5, T4处理的S3的镁含量低于CK, 其余均高于相应CK。可见不同形态氮素处理后多数种质大青叶对磷、钾、钙与镁的吸收增加, 尤其是T3处理的S1-S5的磷、钾、钙与镁的吸收均高于相应CK, 仅T2处理后有

4份种质的钙吸收降低了, 说明铵态氮有可能抑制了钙的吸收。

2.3.2 微量元素的吸收 在CK中, 不同种质苕蓝叶的微量元素含量存在明显的差异 (表3) , 其中S1的铜, S2的锌, S3的镍、铁、锰, S4的硒的含量均为不同种质间的最大值。比较不同处理发现, 不同氮素组合处理后叶内微量元素含量变化较大, 其中T1 处理下仅S1的硒、镍, S2的铁、锰与铜, S3的硒、镍, S4的硒低于相应CK, 而S5仅有铜元素高于相应CK; T2处理下, S1的镍, S2的镍和铁, S3的硒与镍低于相应CK, S4仅锌与镍, S5的锌、铜与镍高于相应CK; T3处理下仅S1与S2的镍, S3的硒与镍, S4的锰、锌、镍与硒, S5的铁与硒元素低于各自CK; T4处理下S1的镍与铜, S2的铁、锰与镍, S3的铁、锰、锌与镍, S4的硒, S5的锌与硒等元素低于相应CK; T5处理下S1的所有元素均高于或等于相应CK, S2的镍, S3的硒, S4的锌和S5的铁、锰与硒元素均低于各自CK; T6处理下S1的锌、铜, S2的锌与镍, S3的镍, S4的硒与锌均低于相应CK, 而S5仅锌含量高于相应CK。比较不同种质间的差异, S1在T5处理后6种微量元素均高于或等于相应CK, S2在T3与T5处理下仅镍低于相应CK, S3在T5与T6处理下仅镍低于相应CK, S4在T1处理下仅硒低于相应CK, S5的6种微量元素在多数处理下均低于相应CK。

综合分析发现, 多数氮素处理有利于不同种质苕蓝叶的必需大量元素磷、钾、钙、镁的积累, 微量元素中出现低于相应CK频率最高的是镍元素, 其次是硒元素。这与前期盆栽试验 (3种氮素24个组合) 的幼苗研究的结果有相似之处。而不同处理间, 5份种质的磷、钾、钙、镁和铜元素在T3处理后均高于相应CK, 说明T3处理最有利于不同种质苕蓝叶矿质元素的吸收。

表3 不同氮素处理对菰蓝叶矿质元素含量的影响

Table 3 Effects of different nitrogen treatments on mineral elements in leaves of *Isatis indigotica*

处理 Treatment	种质 Germplasm	矿质元素 Mineral element									
		磷 P (w/mg g ⁻¹)	钾 K (w/mg g ⁻¹)	钙 Ca (w/mg g ⁻¹)	镁 Mg (w/mg g ⁻¹)	铁 Fe (w/mg g ⁻¹)	锰 Mn (w/mg g ⁻¹)	锌 Zn (w/μg g ⁻¹)	铜 Cu (w/μg g ⁻¹)	镍 Ni (w/μg g ⁻¹)	硒 Se (w/μg g ⁻¹)
对照 Control (CK)	S1	0.57	10.38	5.45	1.15	1.30	0.22	43.57	9.50	17.25	7.68
	S2	0.34	9.72	3.83	1.16	1.85	0.17	65.16	8.14	20.50	4.96
	S3	0.76	10.09	4.15	1.38	2.67	0.45	42.64	9.34	22.81	9.25
	S4	1.40	10.72	5.41	1.11	1.99	0.33	64.51	8.75	16.41	14.78
	S5	1.03	11.03	5.81	1.58	2.59	0.41	52.16	8.50	16.93	11.93
硝态氮100% NO ₃ ⁻ -N 100% (T1)	S1	1.92	12.87	6.06	1.63	2.16	0.39	72.75	9.75	17.00	5.25
	S2	0.37	10.96	4.58	1.02	0.69	0.10	79.59	7.00	21.45	9.95
	S3	2.10	10.34	3.47	1.41	3.75	0.65	87.40	10.50	20.75	7.50
	S4	2.28	12.97	4.20	1.32	2.07	0.38	88.73	9.63	21.39	14.06
	S5	2.85	13.20	7.32	1.68	1.57	0.34	45.78	9.50	13.83	4.86
铵态氮100% NH ₄ ⁺ -N 100% (T2)	S1	1.74	12.09	5.16	1.27	1.90	0.22	69.75	9.50	16.75	11.78
	S2	1.38	12.15	5.44	1.47	1.27	0.33	70.15	11.00	11.01	5.09
	S3	0.61	10.27	3.62	1.42	4.17	0.64	83.89	11.39	20.75	8.20
	S4	1.85	11.87	5.39	1.30	1.36	0.23	65.10	8.50	20.96	7.61
	S5	2.25	12.84	5.31	1.30	1.03	0.31	56.90	9.50	18.25	8.73
铵态氮/硝态氮 (75/25) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (75/25) (T3)	S1	1.26	13.14	5.60	1.42	2.54	0.34	86.73	10.75	16.50	12.92
	S2	1.66	12.44	5.42	1.41	2.03	0.40	80.59	10.75	14.00	15.64
	S3	1.12	11.10	5.10	1.51	3.14	0.65	63.89	12.25	15.08	7.81
	S4	1.45	11.34	6.07	1.33	2.55	0.30	52.15	8.91	14.96	6.38
	S5	1.57	12.97	5.93	1.68	2.06	0.42	79.14	9.50	19.28	8.85
铵态氮/硝态氮 (50/50) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (50/50) (T4)	S1	1.39	12.72	4.76	1.49	1.52	0.31	53.50	9.25	13.13	12.09
	S2	1.12	10.98	5.40	1.30	1.14	0.13	73.91	8.15	19.31	8.50
	S3	1.18	10.56	4.68	1.15	2.19	0.40	36.59	9.93	21.50	13.75
	S4	3.02	12.36	6.32	1.52	3.18	0.42	93.73	9.25	21.14	11.73
	S5	2.03	12.09	6.14	1.61	2.67	0.50	49.25	9.50	17.28	11.10
铵态氮/硝态氮 (25/75) NH ₄ ⁺ -N/NO ₃ ⁻ -N (25/75) (T5)	S1	1.76	12.49	6.35	1.62	1.80	0.32	56.25	9.50	20.00	10.00
	S2	1.85	13.48	5.05	1.60	2.41	0.40	68.04	9.25	12.43	16.75
	S3	0.73	10.51	3.72	1.42	3.13	0.46	66.75	9.50	22.33	6.66
	S4	1.50	12.20	6.84	1.60	2.85	0.46	54.69	8.75	17.99	15.31
	S5	1.44	10.86	6.12	1.26	1.79	0.29	60.60	8.50	18.00	6.91
酰胺态氮100% CO(NH ₂) ₂ -N 100% (T6)	S1	1.40	11.55	6.64	1.49	1.96	0.30	36.65	8.00	17.25	8.75
	S2	1.34	11.31	4.61	1.40	2.64	0.41	42.49	10.58	20.08	6.38
	S3	2.07	10.28	4.48	2.06	7.04	1.03	78.80	12.50	17.00	12.00
	S4	1.57	11.74	6.05	1.62	2.11	0.40	37.24	9.50	19.96	12.95
	S5	1.27	12.84	4.25	1.34	1.59	0.32	65.75	8.00	14.13	6.75

3 讨论

3.1 大青叶内游离氨基酸与氮营养的关系

作为构成蛋白质主要成分的氨基酸,其含量在一定程度上反映植物的氮利用情况和氮代谢状况^[11]。铵态氮处理均显著提高了水培番茄幼苗叶片和根系游离氨基酸含量^[12];氮肥施用适量能明显提高茶叶中的游离氨基酸含量^[13]。本研究中发现不同形态氮素处理5份菰蓝种质后其叶内游离氨基酸的积累响存在一定的差异,随着铵硝比降低(T2-T5),5份种质菰蓝叶的游离氨基酸含量基本呈现下降趋势,这与菠菜茎叶中游离氨基酸总量随着铵硝比的降低呈现下降趋势^[14]基本一致。可见外源供应不同形态及不同比例的氮素直接影响了菰蓝体内的氮代谢,至于氮素对不同种质菰蓝叶内的游离氨基酸的影响尚需要进一步研究。

3.2 菰蓝叶的总黄酮积累与氮素营养的关系

黄酮类成分是药用植物体内的一类活性成分,在栽培生产中也有较多研究,适宜的施氮水平能提高银杏叶片黄酮含量和黄酮总量^[15];适量施用氮肥将有利于荞麦单株水平上的干物质产量和黄酮产量的提高^[16]。菰蓝叶中不仅含有靛蓝、靛玉红等吡啶类生物碱,还含有异牡荆素等黄酮类化合物^[17-19],其黄酮类化合物具有较强的抗氧化作用^[20]。而在菰蓝栽培生产中,药农与研究人员多关注其靛玉红等药典指标的含量,其黄酮类成分含量也能在一定程度上反应其药用质

量。研究发现能够提高4份种质总黄酮含量的T1、T3与T6这3个处理中,100% CO(NH₂)₂-N处理极大地促进了来自于甘肃张掖与陕西商洛的2份种质菰蓝叶总黄酮含量, NH₄⁺-N:NO₃⁻-N为75:25处理则能有效地促进4份种质总黄酮含量,可见铵硝配合施用有利于不同种质菰蓝叶总黄酮含量的积累。

3.3 氮营养与矿质元素吸收的关系

铵态氮和硝态氮是植物吸收氮素的2种主要形态,尿素(酰胺态氮)在土壤pH < 5时顺利转化为铵态氮^[21]。研究结果显示当单独施用铵态氮、硝态氮与酰胺态氮时,多数种质的磷、钾、钙、镁和铜均高于相应CK,而当施用NH₄⁺-N:NO₃⁻-N为75:25时能提高5份种质的5种必需元素含量,说明适宜的铵硝比能有效地促进菰蓝植株对必需矿质元素的吸收。这与晏枫霞等人盆栽试验中较高比例铵态氮促进N与P的积累^[22]一致,而与较高比例硝态氮促进钾与镁积累不甚一致,可能是由于本研究的硝态氮是由KNO₃提供,当硝态氮比例较高时,钾离子可能过剩反而不利于菰蓝对其的吸收。氮素处理后不利于菰蓝对镍、硒元素的吸收,其中镍在叶片中的积累明显受到氮素处理的抑制,与菰蓝苗期盆栽试验的研究结果^[7]一致。作为植物生长必需的微量元素,镍不仅是脲酶的组成成分,也是多种氢化酶、脱氢酶及甲基酶的组分^[23-25],还能影响植物的种子萌发、衰老、氮代谢和铁吸收等代谢过程^[26]。氮素处理不利于菰蓝对镍元素的吸收,是否与氮素施用方式(根际浇灌)有关,尚需进一步的研究。

参考文献 [References]

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 21-22 [State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 21-22]
- 武彦文, 高文远, 肖小河. 大青叶的研究进展[J]. 中草药, 2006, **37** (5): 793-796 [Wu YW, Gao WY, Xiao XH. Advances in studies on Folium Isatidis [J]. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2006, **37** (5): 793-796]
- 肖云华, 赵雪玲, 王康才, 石馨玫, 唐晓清. 不同氮素形态和浓度对大青叶生物量与生物碱类成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, **38** (17): 2755-2760 [Xiao YH, Zhao XL, Wang KC, Shi XM, Tang XQ. Effect of different nitrogen forms and concentrations on biomass and alkaloids of Isatidis Folium [J]. *China J Chin Mat Med*, 2013, **38** (17): 2755-2760]
- 唐晓清, 肖云华, 赵雪玲, 周海凤, 李臻颖, 林志超, 杨月. 不同氮素形态及其比例对菘蓝生物学特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, **20** (1): 129-138 [Tang XQ, Xiao YH, Zhao XL, Zhou HF, Li ZHY, Lin ZHC, Yang Y. Effect of different nitrogen forms and their proportion on biological characteristics of *Isatis indigotica* Fort [J]. *J Plant Nutr Fertil*, 2014, **20** (1): 129-138]
- 温春秀, 翟彩霞, 刘灵娣, 王丽英, 田伟, 陈丽莉, 李若楠, 张彦才. 氮肥对菘蓝生长及氮素吸收的影响[J]. 西北农业学报, 2013, **22** (5): 131-135 [Wen CHX, Zhai CX, Liu LD, Wang LY, Tian W, Chen LL, Li RN, Zhang YC. Effect of N fertilization on growth and content of *Isatis indigotica* [J]. *Acta Agric Bor-Occid Sin*, 2013, **22** (5): 131-135]
- 肖云华, 吕婷婷, 唐晓清, 王康才, 瞿光航, 朱毅斌, 李月鹏. 追施氮肥量对板蓝根的外形品质、干物质积累及活性成分含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, **20** (2): 437-444 [Xiao YH, Lv TT, Tang XQ, Wang KC, Qu GH, Zhu YB, Li YP. Effects of topdressing nitrogen on apparent quality, dry matter accumulation and contents of active components in the root of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *J Plant Nutr Fertil*, 2014, **20** (2): 437-444]
- 吕婷婷, 施晟璐, 唐晓清, 林志超, 赵江涛, 周海凤, 李臻颖, 王康才. 氮素营养对不同产地菘蓝的干物质积累、根外形品质及光合作用的影响[J]. 南京农业大学学报, 2015, **38** (3): 395-401 [Lü TT, Shi SHL, Tang XQ, Lin ZHCH, Zhao JT, Zhou HF, Li ZHY, Wang KC. Effect of nitrogen nutrient on dry matter accumulation, apparent quality and photosynthesis of *Isatis indigotica* Fort. from different areas [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2015, **38** (3): 395-401]
- 吕婷婷, 施晟璐, 唐晓清, 赵雪玲, 王康才. 不同氮素形态和配比对菘蓝根的生长及含氮成分含量和总量的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2016, **25** (1): 62-70 [Lü TT, Shi SHL, Tang XQ, Zhao XL, Wang KC. Effect of nitrogen with different forms and ratios on growth, and content and total amount of nitrogen component in root of *Isatis indigotica* [J]. *J Plant Resour Environ*, 2016, **25** (1): 62-70]
- 唐晓清, 肖云华, 王康才, 吕婷婷. 氮素营养对苗期菘蓝叶中硝酸还原酶活性与矿质元素吸收的影响[J]. 西北植物学报, 2013, **33** (9): 1851-1858 [Tang XQ, Xiao YH, Wang KC, Lü TT. Effect of nitrogen nutrition on nitrate reductase activity and mineral elements absorption of *Isatis indigotica* Fort. at seedling stage [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2013, **33** (9): 1851-1858]
- 刘冬莲. 不同生长期中菘蓝多糖和氨基酸含量变化规律研究[J]. 分子科学学报, 2010, **26** (3): 199-202 [Liu DL. Studies on seasonal variation of amino acid and total polysaccharides in *Isatis Indigotica* Fort [J]. *J Mol Sci*, 2010, **26** (3): 199-202]
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants [M]. Beijing: Science Press, 2002
- 葛体达, 黄丹枫, 芦波, 唐东梅, 宋世威. 无机氮和有机氮对水培番茄幼苗碳水化合物积累及氮素吸收的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14** (5): 604-609 [Ge TD, Huang DF, Lu B, Tang DH, Song SHW. Effect of inorganic and organic nitrogen supply on accumulation of carbohydrate and nitrogen in tomato seedlings under hydroponic culture [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (5): 604-609]
- 苏有健, 廖万有, 丁勇, 王宏树, 夏先江. 不同氮营养水平对茶叶产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, **17** (6): 1430-1436 [Su JY, Liao WY, Ding Y, Wang HSH, Xia XJ. Effects of nitrogen fertilization on yield and quality of tea [J]. *Plant Nutr Fertil Sci*, 2011, **17** (6): 1430-1436]
- 汪建飞, 董彩霞, 沈其荣. 氮素不同形态对比对菠菜体内游离氨基酸含量和相关酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, **13** (4): 664-670 [Wang JF, Dong CX, Shen QR. Effect of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios on the free amino acids and three kinds of enzymes of nitrogen metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) shoot [J]. *J Plant Nutr Fertil*, 2007, **13** (4): 664-670]
- 吴家胜, 应叶青, 曹福亮, 张往祥. 施氮对银杏叶产量及黄酮含量的影响[J]. 浙江林学院学报, 2002, **19** (4): 372-375 [Wu JSH, Ying YQ, Cao FL, Zhang WX. Effects of nitrogen application on leaf output and flavone content in ginkgo leaves [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2002, **19** (4): 372-375]
- 臧小云, 刘丽萍, 蔡庆生. 不同供氮水平对荞麦茎叶中黄酮含量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2006, **29** (3): 28-32 [Zang XY, Liu LP, Cai QSH. Effect of nitrogen supply on flavone and rutin accumulation in stems and leaves of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2006, **29** (3): 28-32]
- 阮金兰, 邹建华, 蔡亚玲. 大青叶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, **30** (19): 1525-1526 [Ruan JL, Zou JH, Cai YL. Studies on chemical constituents in leaf of *Isatis indigotica* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2005, **30** (19): 1525-1526]
- 高桂花, 邓湘昱, 刘娟, 李发美. 大青叶中碳苷黄酮类化合物[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, **24** (12): 748-750 [Gao GH, Deng XY, Liu J, Li FM. Flavone C-glycosides from Folium Isatidis [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2007, **24** (12): 748-750]
- 柳继锋, 张雪梅, 薛多清, 江志勇, 顾琼, 陈纪军. 大青叶的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, **31** (23): 1961-1965 [Liu JF, Zhang XM, Xue DQ, Jiang ZHY, Gu Q, Chen JJ. Studies on chemical constituents from leaves of *Isatis indigotica* [J]. 2006, **31** (23): 1961-1965]
- 刘宣, 赵二芳. 大青叶抗氧化能力的研究[J]. 忻州师范学院学报, 2008, **24** (2): 11-12 [Liu X, Zhao ERL. Study on antioxidant activity of *Isatis indigotica* [J]. *J Xinzhou Teach Univ*, 2008, **24** (2): 11-12]
- 於虹, 王传永, 吴文龙. 蓝紫果栽培与采后处理技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003
- 晏枫霞, 王康才, 唐晓清, 罗春红. 氮素形态对菘蓝活性成分和矿质元素含量的影响[J]. 江苏农业学报, 2010, **26** (4): 735-739 [Yan FX, Wang KC, Tang XQ, Luo CHH. Effects of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratio on the active component and mineral elements contents of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2010, **26** (4): 735-739]
- Drake HL, Hu SL, Wood HG. Purification of carbon monoxide dehydrogenase, a nickel enzyme from *Clostridium thermoaceticum* [J]. *J Biol Chem*, 1980, **255**: 7174-7180
- Ellefson WL, Whitman WB, Wolfe RS. Nickel-containing factor F430: chromophore of the methylreductase of *Methanobacterium* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 3707-3710
- Friedrich CG, Schneider K, Friedrich B. Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* [J]. *J Bacteriol*, 1982, **152**: 42-48
- Brown PH, Welch RM, Cary EE. Nickel: a micronutrient essential for higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1987, **85**: 801-803