



研究报告

Research Report

黄连木雌雄株叶水溶性酚类物质和两种氧化酶活性的比较

李国平[✉], 杨鹭生[✉]

武夷学院茶学与生物学系, 武夷山, 354300

[✉] 通讯作者: ptlgp@126.com; [✉] 作者

植物药与药理学杂志, 2012 年, 第 1 卷, 第 5 篇 doi: [10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005](https://doi.org/10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005)

收稿日期: 2012 年 8 月 28 日

接受日期: 2012 年 8 月 30 日

发表日期: 2012 年 9 月 7 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012, Vol.31, No.8)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

李国平等, 2012, 黄连木雌雄株叶水溶性酚类物质和两种氧化酶活性的比较, 植物药与药理学杂志(online) Vol.1 No.5 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005](https://doi.org/10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005))

引用格式(英文):

Li G.P., et al., 2012, Comparative analysis of water-soluble phenolic substances and oxidases activity in the male and female plant of *Pistacia chinensis*, Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi (online) Vol.1 No.5 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005](https://doi.org/10.5376/jpmp.cn.2012.01.0005))

摘要 黄连木为雌雄异株植物。为探索鉴别黄连木幼苗性别的方法, 应用比色法对其雌雄株不同发育阶段叶片中水溶性酚类物质的含量、过氧化物酶(POD)活性和多酚氧化酶(PPO)相对活性进行测定和比较分析, 结果表明: 不同性别的黄连木叶片水溶性酚类物质含量存在极显著的差异($P < 0.01$); POD、PPO 相对活性在雌雄株间也存在显著差异, 特别在老叶中则存在极显著差异, 认为黄连木雌雄株老叶中的水溶性酚类物质含量差异, 可以作为其性别鉴定的依据, 为进一步研究黄连木植株早期性别鉴定提供参考。

关键词 黄连木, 酚类物质, 多酚氧化酶, 过氧化物酶, 雌雄鉴别

Comparative Analysis of Water-soluble Phenolic Substances and Oxidases Activity in the Male and Female Plant of *Pistacia chinensis*

Li Guoping[✉], Yang Lusheng[✉]

Department of Tea Science and Biology, Wuyi University, Wuyishan, 354300

[✉] Corresponding author, ptlgp@126.com; [✉] Authors

Abstract The *Pistacia chinensis* plant is dioecious. There is a need to identify the sapling sex for reforestation practices. In order to explore an easy method for sex identification of *Pistacia chinensis* plant, this study tested the phenolic substances, the peroxidase (POD) activity and polyphenol oxidase (PPO) activity in female and male tree leaves by colorimetric method. The differences in the content of the phenolic substances and the activities of two oxidases between female and male plants were analyzed through t-test. The results showed that there was a significant difference ($P < 0.01$) in the amount of water-soluble phenolic substances in leaves between the male and female plants. The activities of POD and PPO in male and female were significantly different ($P < 0.05$), especially in old leaves ($P < 0.01$). It was suggested that the sex of *Pistacia chinensis* seedlings might be identified through the comparison of the water-soluble phenolic substances content in old leaves. The paper provided the scientific basis for further research on sex determination of *Pistacia chinensis* plants.

Keywords *Pistacia chinensis*; Phenolic substance; POD; PPO; Sex identification

黄连木(*Pistacia chinensis*)为漆树科植物, 雌雄异株(赵亚洲等, 2010)。黄连木植株叶片秀丽繁茂, 树干挺直, 是优良的园林绿化树种之一; 黄连木果实富含油脂, 是生产生物柴油的主要原料之一(黄剑坚和韩维栋, 2006)。黄连木雄株的树形更优美, 适用于园林绿化; 而作为生物质能源林树种, 黄连木雌株才具有直接的经济价值, 但须配置一定比例的雄株作授粉树之用。黄连木雌雄株在开花前难以从形态上加以区分, 其苗木的早期性别鉴定就成了一个亟待解决的问题, 有必要建立一套准确可靠、简便易行的黄连木幼苗性别鉴定方法, 这对黄连木造林、提高果实产量意义重大。

近年来, 人们从生理生化、细胞和分子等不同水平上寻找雌雄异株植物的性别鉴定方法, 不少研究发现有些树种不同性别的植株在其叶片中酚类物质的含量、氧化酶活性等方面存在差异(李瑞丽等, 2006; 赵林森等, 1998)。詹亚光等发现水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)在一定生长季节雌雄株间叶片水溶性酚类物质含量差异显



著, 且雌雄株间叶片 SOD、POD 相对活性也达到显著或极显著水平(詹亚光等, 2006)。周国章等、李国梁等以及赵林森等分别报道香榧(*Torreya grandis*)、杨梅(*Myrica rubra*)以及复叶槭(*Acer negundo*)叶片中水溶性酚类物质含量在雌雄株间差异显著(李国梁等, 1993; 赵林森等, 1998; 周国章, 1985, 林业科技, (4): 16-19)。丁士林等、艾辛等、温伟庆等分别对猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、银杏(*Ginkgo biloba*)雌雄株的一些氧化酶活性进行了测定, 结果认为通过分析雌雄株中酶活性的差异可推断幼苗性别(艾辛等, 2000; 丁士林等, 1997; 温伟庆等, 2002)。

目前, 有关黄连木的雌雄株性别鉴定方面的研究尚未见报道。本试验对黄连木雌雄株叶片中水溶性酚类物质含量以及 POD、PPO 相对活性进行了比较分析, 为探索黄连木幼苗性别鉴定方法提供参考。

1 结果与分析

1.1 水溶性酚类物质的含量在黄连木雌雄株间的差异

通过对各样本水溶性酚类物质含量进行测定, 结果表明(表 1), 黄连木雄株不同发育阶段的叶片中水溶性酚类物质含量均高于雌株的含量, t 检验结果表明雌雄间水溶性多酚含量差异达到极显著的水平。3 月、5 月和 11 月黄连木雄株叶片水溶性酚类含量分别高于雌株 26.13%、26.89%、42.92%, 叶片中水溶性酚类物质含量于 11 月生长后期达到测定结果的最高值。因此, 如将水溶性酚类物质含量指标用于鉴别黄连木苗木性别, 应该在 11 月底采集老叶作为样本。

表 1 黄连木雌雄株叶水溶性酚类物质含量(mg·g⁻¹FW)比较
 Table 1 The mean concentration of water soluble phenolic substances in female and male tree leaves of *Pistacia chinensis* (mg·g⁻¹FW)

样本	幼叶	成熟叶	老叶
Sample	Young leaf	Mature leaf	Old leaf
雄株	13.95±0.26**	10.57±1.47**	17.55±1.06**
Male			
雌株	11.06±0.78	8.33±1.12	12.28±1.25
Female			

注: ** 表示差异极显著(p < 0.01), 下同
 Note: ** means that values are significantly different at 1 % level (p < 0.01). The same for ones below.

表 2 黄连木雌雄株叶内 POD 相对活性(u·g⁻¹ FW)比较
 Table 2 The relative activity of POD in female and male tree leaves of *Pistacia chinensis* (u·g⁻¹ FW)

样本	幼叶	成熟叶	老叶
Sample	Young leaf	Mature leaf	Old leaf
雄株	1.68±0.61*	2.31±0.67*	3.29±0.74**
Male			
雌株	2.09±0.73	2.86±0.76	4.70±0.82
Female			

*注: *表示与雌株的差异显著(p < 0.05), 下同
 Note: *means that values are significantly different at 5 % level (p < 0.05). The same for ones below.

1.2 POD 和 PPO 氧化酶相对活性在黄连木雌雄株间的差异

通过对黄连木雌雄株不同发育阶段叶片内过氧化物酶(POD)相对活性进行测定, 结果表明(表 2): 不管是雄株或是雌株, 其叶片 POD 相对活性大小顺序为老叶 > 成熟叶 > 幼叶; 比较雌雄株间不同发育阶段叶中的 POD 相对活性均值的差异, 均表现为雌株高于雄株的, 黄连木雌株幼叶、成熟叶和老叶 POD 相对活性均值分别高于雄株 24.41%、23.81%、42.86%, 根据 t 检验结果, 幼叶、成熟叶内 POD 相对活性在雌雄株间差异达到显著的水平, 老叶内 POD 相对活性在雌雄株间差异达到极显著的水平。

表 3 雌雄株黄连木叶内 PPO 相对活性比较(u·g⁻¹ FW)
 Table 3 The relative activity of PPO in female and male tree leaves of *Pistacia chinensis*(u·g⁻¹ FW)

样本	幼叶	成熟叶	老叶
Sample	Young leaf	Mature leaf	Old leaf
雄株	0.85±0.11*	0.79±0.06**	0.98±0.10**
Male			
雌株	1.07±0.08	1.02±0.07	1.28±0.14
Female			

*注: N: 核苷酸; P: 蛋白质注: ** 表示差异极显著(p < 0.01), 下同
 Note: ** means that values are significantly different at 1 % level (p < 0.01). The same for ones below.

不同发育阶段的叶片中 PPO 氧化酶相对活性测定结果表明(表 3): 不管是雄株或是雌株, 其叶片 PPO 相对活性大小顺序为老叶 > 幼叶 > 成熟叶; 雌雄株间各发育阶段的叶内 PPO 相对活性均值的差异也均表现为雌株



显著高于雄株, 雌株幼叶、成熟叶和老叶 PPO 相对活性均值分别高于雌株 25.88%、29.11%、30.61%, 根据 t 检验结果, 幼叶内 PPO 相对活性在雌雄株间差异达到显著的水平, 成熟叶、老叶内 PPO 相对活性在雌雄株间差异达到极显著的水平。

根据各发育阶段叶中 POD 和 PPO 氧化酶相对活性测定结果, 2 种氧化酶相对活性在不同性别的黄连木植株中存在显著或极显著的差异, 均表现为雌株高于雄株。

2 讨论

高等植物的性别是由一些相关基因决定的(高武军等, 2008)。植株性别不同, 其内部生理生化指标存在规律性差异, 同工酶、酚类物质和一些氧化酶活性等生理生化指标常被用于植物性别的早期鉴定(李瑞丽等, 2006)。

本文结果表明: 黄连木雄株叶片中水溶性酚类物质含量高于雌株。据报道, 水曲柳(詹亚光等, 2006)、香榧(周国章, 林业科技, 1985(4): 16~19)叶片中所含水溶性酚类物质也表现为雄株高于雌株, 但复叶槭(赵林森等, 1998)、银杏及猕猴桃(李国梁等, 1993)、千年桐(*Aleurites montana*)(苏梦云等, 1987, 经济林研究, 5(2): 18-21)、杨梅(李国梁等, 1993: 1995)等树种雌雄株间叶片酚类物质含量差异表现与本实验结果相反, 表现为雌株高于雄株, 说明水溶性酚类物质含量在不同树种雌雄株中表现不同。不同性别的黄连木叶片中 POD 及 PPO 相对活性也存在显著或极显著的差异, 两种氧化酶相对活性均表现为雌株高于雄株。黄瓜纯雌株子叶和真叶的 POD 及 PPO 活性比雌雄株酶活性强(艾辛等, 2000), 构树(*Broussonetia papyrifera*)过氧化物酶活性也表现为雌株高于雄株(赵云云等, 1996), 与本实验结果接近; 但是, 一些树种中有关氧化酶活性在雌雄株间的差异表现与本实验结果相反, 表现为雄株高于雌株, 如詹亚光等报道水曲柳雄株叶片 SOD、POD 及 PPO 活性均高于雌株(詹亚光等, 2006), 温伟庆等报道银杏雄株叶片中的过氧化物酶和过氧化氢酶活性均大于雌株(温伟庆等, 2002), 说明部分氧化酶活性在不同树种雌雄株中表现也不同。

比较分析不同发育阶段的黄连木叶内水溶性酚类含量、POD 和 PPO 氧化酶相对活性均值在雌雄株间差异大小, 认为老叶的有关指标在雌雄株间差异最大, 因此, 建议在本地气候条件下采集 11 月的老叶进行相关指标的测定作为其性别鉴定的依据。由于有关氧化酶活性的测定相对比较复杂, 且酶活性易受环境因素影响, 所以, 认为应用黄连木老叶内水溶性酚类物质含量差异进行植株的性别鉴定较为可靠。但是, 本研究尚未能提供一个能明确区分黄连木雌雄株的水溶性酚类物质含量标准, 此研究只能在黄连木植株早期性别鉴定中提供一定的参考, 还需要进一步的完善。

虽然在雌雄异株植物性别鉴别中采用生理生化指标差异方法是可行的, 且此方法在生产实践中具简单、快速、经济的优点, 但此方法只可作为一种粗略的鉴别方法。通过筛选、寻找雌雄植株间 DNA 分子差异, 利用 DNA 分子标记技术, 才是鉴定植株性别的一种较可靠的方法。

黄连木是未来生态能源林建设和生物柴油产业发展的重要树种, 开展黄连木性别早期鉴定研究具有重要的实践意义。本研究比较分析了不同发育阶段叶片中水溶性酚类物质含量、POD 及 PPO 酶相对活性在雌雄株间的差异表现, 结果表明: 黄连木雄株叶片中水溶性酚类物质显著含量高于雌株, 雌株叶片中 POD 及 PPO 两种氧化酶相对活性均显著高于雄株, 认为通过测定黄连木老叶中的水溶性酚类物质含量, 可以作为其性别鉴定的指标。本研究可为以后黄连木植株早期性别鉴别的研究提供参考。

3 材料与方 法

3.1 实验材料

实验材料采自福建莆田市秀屿区石码村和仙游县盖尾镇石井村成年黄连木雌雄植株, 于 2010 年 3 月中旬采集幼叶样本, 5 月中旬采集成熟叶样本, 11 月下旬采集老叶样本, 每次在雌雄株的同一高度, 同一方位采集当年生枝条上样本各 15 份, 及时洗净、拭干, 放入手提冰箱带回实验室备测。

3.2 水溶性酚类物质的测定

将样品放入 110℃干燥箱内杀青 40 min, 然后调节温度至 80℃烘干约 6 h, 直至恒重, 将烘干样品于研钵中研磨成粉末, 备用。参考阮宇成和李名君的酒石酸铁比色法(阮宇成和李名君, 1983)用 UV-1240 可见紫外分光光度计(日本岛津)测定样品中水溶性酚类物质含量, 试验重复 4 次。



3.3 氧化酶活性的测定

分别称取各样品 0.5 g, 剪碎, 放入研钵中, 加入适量 pH 6.0 的磷酸缓冲液、少许聚乙烯吡咯烷酮(pvp)及石英砂, 于冰浴条件下研磨成匀浆, 转移到离心管, 于 4 °C、4000 r/min 条件离心 15 min, 取上清液为酶提取液, 于 4 °C 冰箱中贮存备用。POD 酶活性的测定参考朱广廉等的方法(朱广廉等, 1990), PPO 酶活性的测定参考刘金龙和杨秀清的方法(刘金龙和杨秀清, 2002)。2 种氧化酶活性值均为相对活性值。酶活性的测定试验重复 3 次。

使用 SPSS17.0 统计学软件对以上实验结果进行 t 检验分析, 确定水溶性多酚含量及部分氧化酶活性在黄连木不同性别中差异的显著性。

作者贡献

通讯作者李国平是项目负责人, 具体执行研究的实验设计和论文撰写, 杨鹭生进行了水溶性酚类物质含量以及 POD、PPO 相对活性的测定和数据分析。

致谢

本项目由福建省科技计划重点项目(No.2009N0048); 福建省教育厅科技项目(No.JA09206)共同资助。感谢福建莆田学院环境与生命科学系为本研究提供实验平台。

参考文献

- Ai X., Zhu L.L., Shu L.H., Tao X.M., and He G.C., 2000, Correlation of sex expression and three oxidase isozyme in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.), *Journal of Wuhan Botanical Research*, 18(3): 184-188(艾辛, 祝莉莉, 舒理慧, 陶晓明, 何光存, 2000, 黄瓜植株性别表现与 3 种氧化酶同工酶的关系, *武汉植物学研究*, 18(3): 184-188)
- Ding S.L., Zhu X.Z., and Hong Z., 1997, Studies on peroxidase isoenzyme of Yangtao, *Actinidia chinensis*, *Journal of Anhui Agricultural University*, 24(4):395-397(丁士林, 朱秀珍, 洪泽, 1997, 猕猴桃过氧化物同工酶研究, *安徽农业大学学报*, 24(4):395-397)
- Gao W.J., Ji Y.K., Xiao L.H., Hong D., Deng C.L., and Lu L.D., 2008, Research Progress of Sex Determination Associated Function Genes in Dioecious Plants, *Journal of Plant Genetic Resources*, 9(1):125-129(高武军, 姬艳克, 肖理会, 洪达, 邓传良, 卢龙斗, 2008, 雌雄异株植物性别决定相关功能基因研究进展, *植物遗传资源学报*, 9(1):125-129)
- Huang J.J., and Han W.W., 2006, The Current Research and Perspective Utilization on the Energy Tree Species in China, *Guangdong Forestry Science and Technology*, 22(4):105-110(黄剑坚, 韩维栋, 2006, 我国主要木本能源植物的研究现状及利用前景, *广东林业科技*, 22(4):105-110)
- Li G.L., Lin B.N., and Shen D.X., 1993, Sex Identification of Horticultural Dioecious Plants by Phenolics Analysis, *Acta Horticulturae Sinica*, 20(4): 397-398(李国梁, 林伯年, 沈德绪, 1993, 酚类物质在鉴别园艺雌雄植物中的应用研究, *园艺学报*, 20(4): 397-398)
- Li G.L., Lin B.N., and Shen D.X., 1995, Study on the sex identification of *Myrica rubra* L., *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 21(1): 22-26(李国梁, 林伯年, 沈德绪, 1995, 杨梅雌雄株同工酶和酚类物质的鉴别, *浙江农业大学学报*, 21(1): 22-26)
- Li R.L., Lu L.D., Gao W.J., Li S.F., and Wang Q., 2006, Advances in sex identification of dioecious plants, *Guihaia*, 26(4):387-391(李瑞丽, 卢龙斗, 高武军, 李书粉, 王琼, 2006, 雌雄异株植物性别鉴定的研究进展, *广西植物*, 26(4):387-391)
- Liu J.L., Yao Y.T., and Yang X.Q., 2002, Research on Polyphenoloxidase and Superoxide Dismutase of Kernel apricot, *Shanxi Forestry Science and Technology*, 2(2): 38-41(刘金龙, 杨秀清, 2002, 仁用杏树多酚氧化酶和超氧化物歧化酶的研究, *山西林业科技*, 2(2): 38-41)
- Ruan Y.C., and Li M.J., eds., 1983, *Handbook on Tea Physiology and Tea Biochemistry Experiments*, Beijing Agriculture Press, Beijing, China, pp.165 - 166(阮宇成, 李名君, 主编, 1983, 茶树生理及茶叶生化实验手册, 北京农业出版社, 中国, 北京, pp.165 - 166)
- Wen W.Q., and Chen Y.Y., 2002, The Activity Difference Studies on the Peroxidase and Catalase of *Ginkgo biloba* Female and Male Plants, *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, 29(2): 34-39(温伟庆, 陈友吾, 2002, 银杏雌雄株过氧化物酶和过氧化氢酶活性差异研究, *福建林业科技*, 29(2): 34-39)
- Zhan Y.G., Ji L.L., Qi L., and Guo Y.R., 2006, The Phenolic Substances and Several Oxydases in Female and Male plants for *Fraxinus mandshurica*, *Scientia Silvae Sinicae*, 42(7): 131-136(詹亚光, 纪丽丽, 亓磊, 郭艳茹, 2006, 水曲柳雌雄株酚类物质和几种氧化酶活性的比较, *林业科学*, 42(7): 131-136)
- Zhao Y.Z., Xin Y.F., Ma Q.Y., and Zhang C.Y., 2010, Population sex ratio and spatial distribution of dioecious tree species *Pistacia chinensis*, *Chinese Journal of Ecology*, 29 (6):1087-1093(赵亚洲, 辛雅芬, 马钦彦, 张春雨, 2010, 雌雄异株树种黄连同种群性比及空间分布, *生态学杂志*, 29 (6):1087-1093)
- Zhao L.S., Cheng X.Y., Xu X.Z., Fan X.M., Cui P.Y., and Nie H.J., 1998, Comparative Analysis on Water Soluble Phenolic Substances in Male and Female Plant Leaves of *Acer negundo* L., *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 21(3):229-232(赵林森, 程向阳, 徐锡增, 樊新民, 崔培毅, 聂虎军, 1998, 复叶槭雌雄株叶片中水溶性酚类物质的比较分析, *新疆农业大学学报*, 21(3):229-232.)
- Zhao L.S., Xu X.Z., Cui P.Y., and Fan X.M., 1998, Studies on Plant Sex Identification of Dioecious Tree Species, *Journal of Nanjing Forestry University*, 22(1):71-74(赵林森, 徐锡增, 崔培毅, 樊新民, 1998, 雌雄异株树种植物性别鉴定的研究, *南京林业大学学报*, 22(1):71-74)
- Zhao Y., Tian R.L., Liu J.P., and Yan Y.X., 1996, Comparative Study on Isoperoxidase in the Female and Male Plant (*Broussonetia Papyrifera*), *Journal of Capital Normal University(Natural Science Edition)*, 17(2): 84-87(赵云云, 田汝岭, 刘捷平, 闫毓秀, 1996, 雌雄构树过氧化物酶同工酶的比较研究, *首都师范大学学报:自然科学版*, 17(2): 84-87)
- Zhu G.L., Zhong H.W., and Zhang A.Q., 1990, *Experimental Guide for Plant Physiological*, Peking University Press, Beijing, China, pp.242-245(朱广廉, 钟海文, 张爱琴, 1990, 植物生理学实验, 北京大学出版社, 中国, 北京, pp.242-245)