

技术与方法 Techniques and Methods

加拿大一枝黄花茎秆木质素含量和木质素化程度的测定方法

常晨, 程继亮, 强胜, 宋小玲*, 张裕*

南京农业大学杂草研究室, 南京210095

摘要: 测定木质素含量的方法主要有Klason法和巯基乙酸(TGA)法, 其中Klason法测定类型较全面, 而TGA法主要用于测定 β -O-4型木质素含量。Fasga染色法和Quantifasga法可用于观察和测定木质部和韧皮部木质素化程度。为了探究上述方法是否能用于测定加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis*)茎秆木质素含量和木质素化程度, 为进一步研究木质素与其入侵能力的关系提供试验方法, 本研究选用采集于南京、南通和宁波3个地区的加拿大一枝黄花种群, 在生长期和成熟期分别测定了它们的株高和茎直径; 利用上述方法测定其茎秆木质素含量及木质部和韧皮部木质素化程度。结果显示, 南京种群成熟期株高、茎直径均显著高于其他2个种群。Klason法、TGA法的测定结果显示, 3个地理种群生长期的木质素含量没有显著差异; 且随着生长发育期的延长均显著增加; 成熟期南通种群具有最高的总木质素含量。Fasga染色法和Quantifasga法测定结果显示, 在生长期各地理种群木质部和韧皮部木质素化发育程度相似; 但在成熟期, 南京种群木质部木质素化程度显著高于宁波种群。上述结果表明, Klason法和TGA法都能有效测定加拿大一枝黄花木质素含量, 由于测定的木质素类型不同, 建议根据实验目的选择; Fasga染色法及Quantifasga法能应用于加拿大一枝黄花茎秆木质素化程度的定性和定量研究。

关键词: 加拿大一枝黄花; 木质素; Klason; TGA; Quantifasga

加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis*)为菊科一枝黄花属多年生草本植物, 原产于北美, 现已成功入侵欧洲中西部、亚洲大部以及澳大利亚和新西兰等地, 成为一种世界性的入侵杂草(Weber 2001; Lu等2007; Li等2017)。国内外大量的工作致力于其生长发育特性、繁殖生物学、抗逆性等入侵机制相关的研究(Abhilasha等2008; Zhang等2009, 2011; Shimazu等2014; Fenesi等2015), 而这些生理特征同植物茎秆的木质素含量及木质素化程度有着密切的关联(Wilson和Merten 1995; Jung和Casler 2006; Barros-Rios等2012)。目前为止, 加拿大一枝黄花茎秆的木质素含量及木质素化程度的研究还没有相关报道。

木质素广泛的存在于绿色植物中, 用于增强植物组织的机械强度和水分输导能力。木质素由三种单体通过 β -O-4和C-C键连接在一起, 因此其类型也被分为 β -O-4型和C-C型。在木质素含量的测定中, 巯基乙酸(thioglycolic acid, TGA)法和Klason法是目前运用较广泛的方法(Hatfield和Fukushima 2005)。TGA法的原理是木质素结构中苯甲醇聚合物在碱性条件下会溶解, 因此可以通过测量280 nm处的吸收光谱来定量。由于该方法对木质素聚合物中 β -O-4键的特异性, 因此被认为是测量 β -O-4

型木质素含量最有效的方法(Suzuki等2009)。TGA法操作简单, 适合大量样品的筛选, 已经大量地用于草本植物的木质素含量测定(Suzuki等2009)。Klason法是经典的木质素含量分析方法, 该方法的原理是将植物材料在72%的硫酸中进行加热溶解, 通过酸解法去除材料中的非木质素成分, 最后通过称量试验前后的重量, 计算出材料中木质素的含量。该方法虽操作较复杂, 但可用于样品总木质素含量的测定, 因此也被广泛用于测定木本植物及 β -O-4型木质素含量较低的植物样品中的木质素。

由于木质素在植物抗性研究中具有较好的参考价值, 越来越多的研究致力于了解植物细胞壁的木质素化对于植物抗病、抗逆等生理功能的影响。这些研究中, 木质素在不同组织中的分布往往比单纯的木质素总含量更重要。Jung和Casler (2006)在研究玉米茎秆不同组织木质素化程度时指出, 相对于髓部的薄壁组织及维管束, 表皮附近的厚壁组织及维管束木质素化程度更高, 这对于植物

收稿 2018-03-01 修定 2018-04-23

资助 国家重点研发计划(2017YFC1200105)、国家自然科学基金(31401760)和国家公益性行业专项(201409061)。

* 共同通讯作者: 宋小玲(sxl@njau.edu.cn)、张裕(zhangyu2013@njau.edu.cn)。

抵御疾病功能的贡献更大。Xu等(2011)在研究棉花抵御黄萎病的生理原因时也指出,维管组织的木质素化对于植物产生疾病的抗性至关重要。

为深入研究植物不同组织中的木质素化差异,已开发多种木质素组织学染色方法。Méchin等(2005)比较了Maule、phloroglucinol和Fasga三种木质素染色方法后指出,Fasga染色法可将植物切片上木质素化的部分染成红色,并且将非木质素化的部分染成蓝色,这是目前为止考察不同组织中的木质素分布最有效的方法。但上述传统的染色方法存在一个很大的缺陷,即无法量化染色的结果。据此,Zhang等(2013)在先前的研究基础上开发了Quantifasga法,将茎秆从髓部至表皮分为80个区域,计算每个小区域的红色与蓝色的比值,这就方便了对样品进行木质素化程度的定量评估,该方法已成功用于量化玉米茎秆组织角度木质素化程度。

为探究Klason法、巯基乙酸(TGA)法和Fasga茎秆组织学染色法及Quantifasga法是否能有效用于测定加拿大一枝黄花茎秆木质素含量和木质素化程度,以便进一步探讨木质素含量及木质素化程度是否与其入侵能力有关系,本研究选取了入侵江苏和浙江的加拿大一枝黄花3个地理种群,采集了2个生长时期的茎秆样品,首先运用Klason法和TGA法测定了样品茎秆的木质素含量;同时运用Fasga茎秆组织学染色法及Quantifasga法,考察了种群之间和植物生长发育过程中茎秆木质素含量及韧皮部和木质部的木质素化差异。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的3个加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis* L.)地理种群分别采集于南京、南通和宁波(表1)。2013年12月20日,将采集的各地理种群种子统一播种在南京农业大学杂草实验室牌楼试验田内,于次年开始取样。

表1 加拿大一枝黄花材料表

Table 1 The materials of *Solidago canadensis*

种群编号	经度/°	纬度/°	采集地点
ZHW	118.83	32.05	江苏省南京市中山植物园
HM	121.24	31.93	江苏省南通市海门县江心沙农场
NBM	121.53	29.872	浙江省宁波市江东区苗圃

1.2 方法

1.2.1 株高及茎直径测量和采样

在2014年加拿大一枝黄花各地理种群均生长发育后,在其生长期(7月15日)和成熟期(9月15日)分别进行株高和茎直径的测量,每个种群随机测量10株;并在每个地理种群中,随机选择3个植株,采集地上部分茎秆,标记为该种群的茎秆1、2、3号。

1.2.2 茎秆样品处理

将每个植株去除叶片,只留茎秆;在每个茎秆中部取1~2 cm厚的茎段,置于固定液(75%乙醇:甲醛=19:1)中固定,用于冰冻切片,为Fasga茎秆组织学染色法及Quantifasga法研究提供试验材料。剩余部分用粉碎机(MDJ-A01Y1)打磨成粉末状(颗粒直径<0.5 mm)。用50 mL离心管称取粉末至1/2处,加入95%乙醇淹没粉末,放入烘箱中(60~80°C)处理7 h;之后依次用无水乙醇、去离子水、无水乙醇(每个步骤为6 h)提取样品,利用叶绿素作为指示剂,待液体变为无色透明时烘干,该样品为茎秆的细胞壁,用于Klason法和TGA法测定木质素含量。

1.2.3 Klason法测定木质素含量

Klason法参考Schwanninger和Hinterstoisser(2002)提供的方法操作,每个种群测定3株,每株重复测定3次。

1.2.4 TGA法测定木质素含量

TGA法测定木质素含量参考Suzuki等(2009)提供的方法操作。每个种群测定3株,每株重复测定3次。

1.2.5 加拿大一枝黄花茎秆冰冻切片法组织学研究

将1.2.2中固定的样品进行冷冻切片。Leica CM 1950冰冻切片机的条件设置为:箱体-20°C,冷冻头-18°C;冷冻时间20 min。切片的基本步骤包括包埋和切片。(1)包埋:用OCT包埋剂将茎段包裹后冷冻,垂直粘在样品砧上;(2)切片:放下防卷板,手摇切片。在切片过程中调整刀座角度和防卷板与刀片之间的间隙,以获得较好的切片。切片厚度为150 μm。制成的切片按Zhang等(2013)提供的Fasga染色法进行染色(Tolivia和Tolivia 1987),每个样品随机选取染色完成的3个切片制成临时装片,用体式显微镜(OLYMPUS-SZX7)观察图像并用OLYMPUS-DP71显微数码CCD采集图像。采集好的Fasga染色切片照片使用ImageJ软件中的

Quantifasga插件处理,用于量化茎秆切片的Fasga染色照片(Zhang等2013)。每个染色照片中的茎秆不同组织木质素化的面积和染色程度通过软件运算得出相应值[用木质素分配率(%)表示],此法可快速量化茎秆组织角度木质素化程度。

1.3 数据处理和统计分析

采用SPSS 20.0单因素方差分析进行种群间的差异分析,运用独立样本 t 检验进行时期间的差异分析,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 实验结果

2.1 加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期株高与茎直径差异比较

加拿大一枝黄花3个地理种群在生长期及成熟期的株高与茎直径如图1所示。在生长期,ZHW种群的株高显著高于NBM, HM种群与ZHW及NBM无显著差异;在成熟期ZHW种群株高显著高

于其他2个种群。3个地理种群在成熟期的株高均显著高于生长期,ZHW、HM和NBM种群分别升高了39.8%、26.7%和26.6%。茎直径的发育特征与株高相似,在生长期,ZHW的茎直径与另外2个种群无显著差异,但成熟期ZHW的茎直径最大;从生长期至成熟期,3个种群茎直径皆显著增长,ZHW、HM和NBM种群分别升高了51.6%、22.1%和37%。

2.2 加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期茎秆木质素含量分析

分析用Klason法和TGA法测得的加拿大一枝黄花3个地理种群生长期和成熟期茎秆的木质素含量(图2),发现各地理种群木质素含量在成熟期均比生长期显著增高。在生长期,两种方法测得的3个种群茎秆木质素差异均不显著;在成熟期,用Klason法测得的结果是HM种群木质素含量显著高于NBM和ZHW种群,而TGA法测得的结果是HM与NBM种群木质素含量无显著差异,且均显著高于ZHW种群。

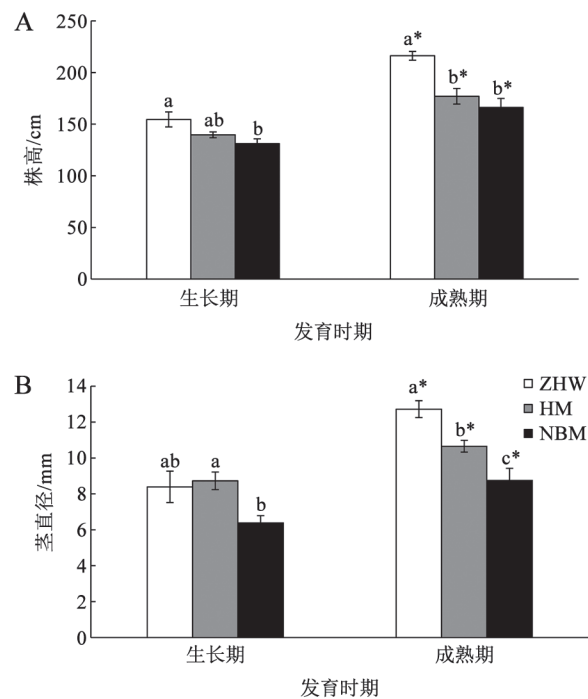


图1 加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期株高与茎直径比较

Fig.1 Comparison of plant height and stem diameter in different stages of the three populations of *S. canadensis*

A: 株高; B: 茎直径。不同小写字母表示同时期内不同种群间的差异显著,*表示同种群不同时期的差异显著($P<0.05$),图2、5同此。

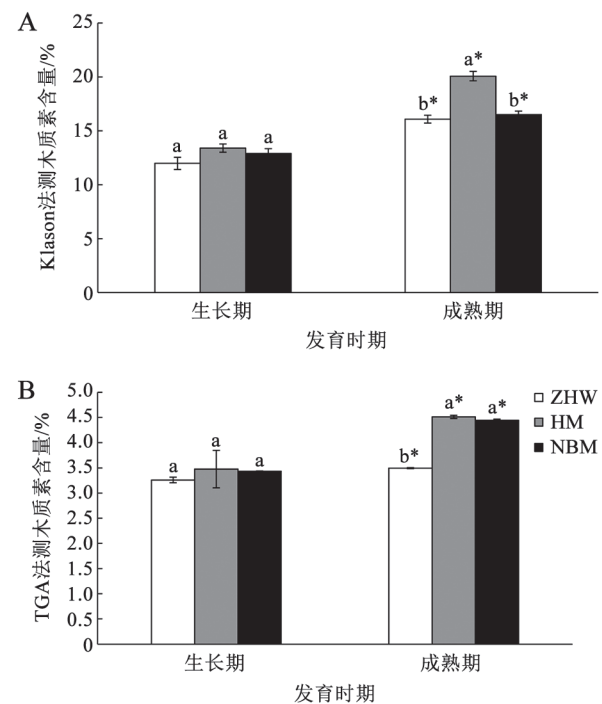


图2 两种方法测得的加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期茎秆木质素含量比较

Fig.2 Comparison of lignin content in different stages of the three populations of *S. canadensis* by two methods

A: Klason法测得的木质素含量比较; B: TGA法测得的木质素含量比较。

2.3 Fasga法及Quantifasga法测定加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期茎秆木质素化差异

观察用Fasga法对加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期的茎秆切片染色结果(图3),发现染色后加拿大一枝黄花成熟的维管组织中韧皮部(phl)及木质部(xyl)皆呈现红色(图3-A),而茎秆中的髓部以及形成层区域则呈现出蓝色。各种群生长期茎秆切片染色差异不显著,成熟期茎秆韧皮部和木质部染色面积及染色程度均有明显增加。比较成熟期3个种群的切片染色照片可以发现,ZHW种群木质部染色程度最深,NBM种群木质部面积最小,染色最浅。

分析用Quantifasga法量化ZHW种群生长期3个单株茎秆的Fasga染色切片(图4-A)得到茎秆木质素化分布曲线(图4-B),可见同种群、同一时期不同茎秆的木质素化分布存在一定的差异。分别对每个曲线的2个峰求积分,并计算平均值,便得到了ZHW茎秆韧皮部和木质部木质素化程度平均数值(图4-C)。该时期ZHW木质部的木质素化程度平均值高出韧皮部5.3554,差异达到极显著。用Quantifasga法量化本研究中的3个种群两个生长期茎秆韧皮部和木质部的木质素化情况(图5),发现生长期无论是韧皮部还是木质部,种群间木质素化水平差异均不显著。成熟期种群间维管组织木质素化差异主要体现在木质部,ZHW种群木质部木质素化程度与HM种群相近且显著高于NBM种群。

3 讨论

3.1 加拿大一枝黄花3个地理种群能用于茎秆木质素化的差异研究

本研究发现,相对于生长期,加拿大一枝黄花3个地理种群成熟期株高、茎直径均有显著增长;且不同种群间发育特征差异较大,ZHW种群株高、茎直径增长速率最快(图1)。这一结果说明,本研究选取的两个发育时期不同地理种群的加拿大一枝黄花材料生长发育能力差异显著,能用于茎秆木质素化的差异研究。

3.2 Klason法和TGA法均可用于测定加拿大一枝黄花茎秆木质素含量

随着茎秆的生长发育,Klason法和TGA法测得的木质素含量均显著升高,说明加拿大一枝黄

花茎秆的生长发育过程中伴随着木质素的积累。本研究中,3个地理种群茎秆在生长期有相似的木质素含量,而在成熟期却表现出差异;这说明随着茎秆的发育,不同种群茎秆发育呈现出较大的分化。在株高与茎直径的研究中(图1),ZHW种群生长速度最快;而在木质素含量的研究中(图2),在成熟期,Klason法测得的ZHW种群的木质素含量与NBM种群的相近,均显著低于HM种群,TGA法测得的ZHW种群的木质素含量最低。已有许多研究表明在茎秆的生长发育过程中,茎秆过度木质素化会影响细胞壁的延展性从而阻碍茎秆的伸长(Fan等2006; Blum 2011; Bellaloui 2012),这也解释了为什么成熟期ZHW种群木质素含量最少,而株高和茎直径却最大。

在本研究中,对相同样品用TGA法测得的木质素含量均低于Klason法测得的值,这一结果与其他研究中得到的结果相似(Brinkmann等2002)。TGA法主要作用于木质素中的 β -O-4键,因此该方法被认为是测量 β -O-4型木质素含量最有效的方法(Suzuki等2009),但是仍然有其他类型的化学键如C-C键参与了木质素单体间的聚合(Ralph等1995),比较而言,Klason法测得的木质素含量能较全面的代表材料整体的木质素含量(Hatfield和Fukushima 2005)。Klason法测得的成熟期木质素含量HM种群显著高于NBM种群(图2-A),但TGA法测得的HM种群与NBM种群木质素含量相似(图2-B),说明HM种群茎秆整体木质素含量较高,但 β -O-4型木质素含量与NBM相似,因此HM种群C-C型木质素含量最高。事实上,木质素可被分成高聚木质素(core lignin)和低聚木质素(non-core lignin)两种,高聚木质素包含高度浓缩的C-C型木质素聚合物,被认为对于增强茎秆的机械强度和抗逆性有很大帮助;而低聚木质素内木质素单体的结合方式较松散,多为 β -O-4型木质素,被认为可以有效增强茎秆的抗酶解能力(Casler和Jung 2006)。本研究中加拿大一枝黄花3个地理种群茎秆不同特性的木质素含量表现出的差异,暗示着这些地理种群具有不同的生理特性,这对于进一步考察加拿大一枝黄花入侵机制是非常有价值的。

3.3 采用Fasga和Quantifasga法可定性和定量测定加拿大一枝黄花茎秆木质素程度

木质素的存在对于植物的生长发育、抗逆、

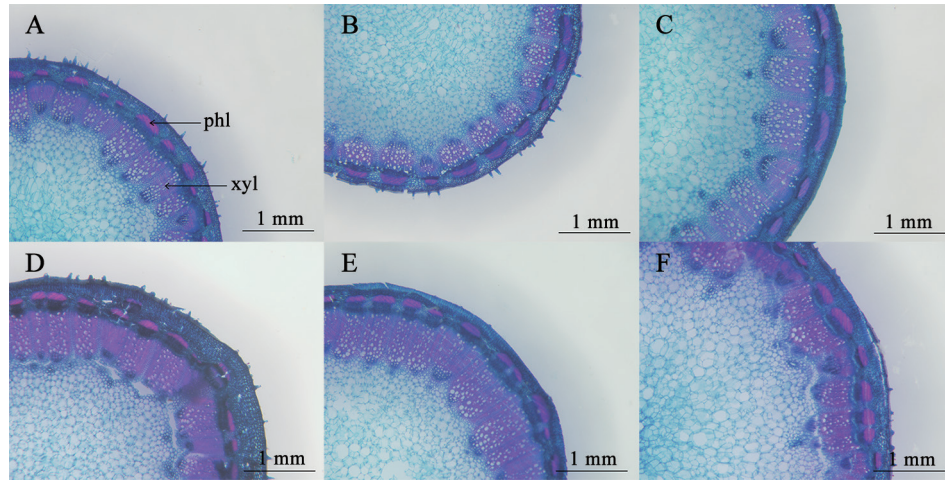


图3 加拿大一枝黄花3个种群不同生长时期的茎秆切片Fasga染色图(40倍放大)

Fig.3 Fasga stained stem cross sections in different stages of the three populations of *S. canadensis* (40×zoom)
A~C分别对应生长期的ZHW、HM、NBM种群; D~F分别对应成熟期的ZHW、HM、NBM种群。图A中phl: 韧皮部; xyl: 木质部。

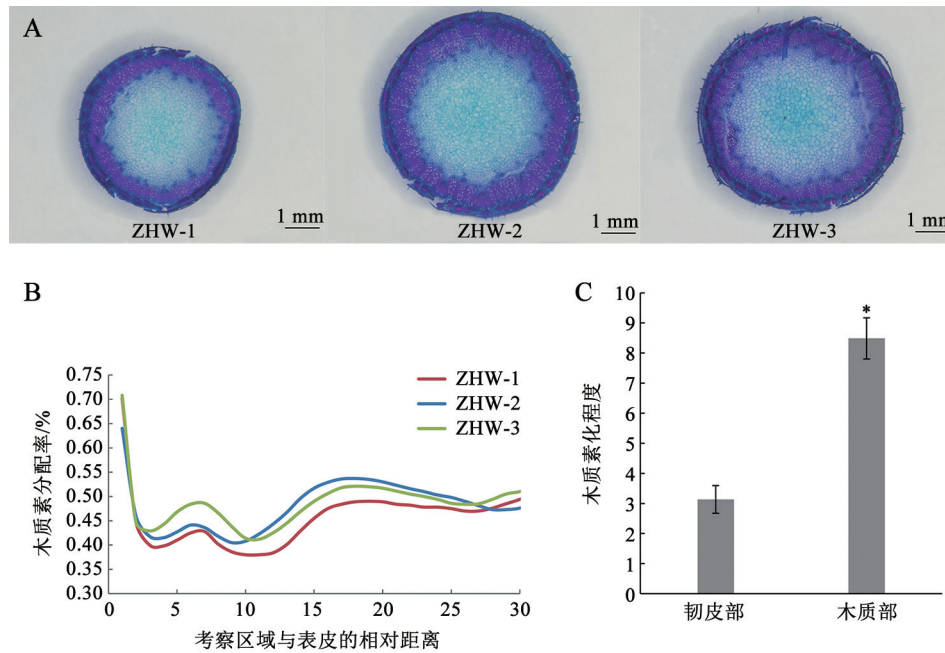


图4 Quantifasga法量化加拿大一枝黄花ZHW种群生长期3个单株茎秆木质素化程度

Fig.4 The lignification of stem cross sections of three individuals from ZHW population in growing stage stained by Quantifasga

A: 生长期ZHW种群3个单株茎秆Fasga染色图(12.5倍放大); B: Quantifasga法量化得到的茎秆不同区域(以其与表皮的相对距离为横坐标)木质素化程度分布曲线; C: 种群ZHW 生长期韧皮部和木质部相对木质素化程度量化结果。*表示韧皮部与木质部之间差异显著($P < 0.05$)。

抗病虫害均有十分重要的作用。研究发现, 木质素对于植物茎秆这些生理功能的贡献不仅体现在含量上, 其在茎秆组织中的分布更重要(Jung和Casler 2006; Barros-Rios等2012)。双子叶植物茎秆的木质素化发育主要发生在维管组织的纤维和导管中, 分别起到不同的作用: 纤维(例如韧皮纤维和木纤

维)对于增强茎秆的机械强度有很大贡献, 而导管对于水分和无机盐的输导十分重要。Fasga染色结果(图3)表明, 加拿大一枝黄花茎秆韧皮部和木质部的木质素化程度较其他组织(髓部和形成层)高, 并且各种种群维管组织的木质素化情况相似, 伴随着茎秆的生长发育, 维管组织面积和木质素化程

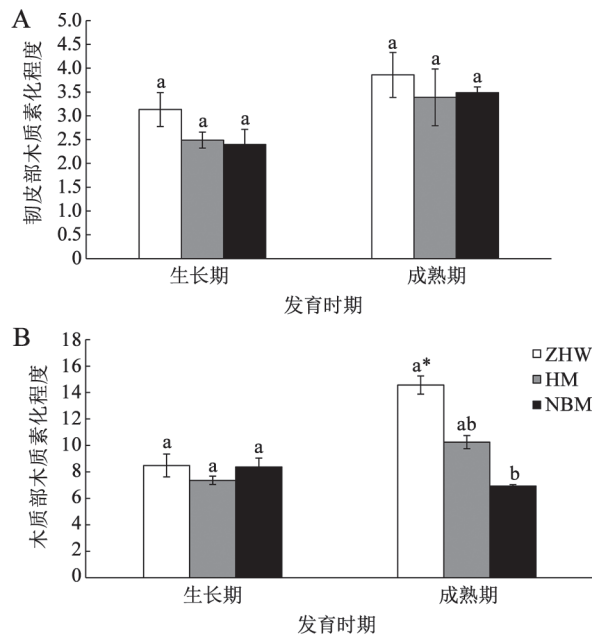


图5 Quantifasga法量化得到的加拿大一枝黄花3个地理种群不同发育时期茎秆木质素化程度比较

Fig.5 Comparison of the lignification of stem cross sections in different stages of three populations of *S. canadensis* by Quantifasga

A: 韧皮部木质素化程度比较; B: 木质部木质素化程度比较。
*表示两个发育时期之间的差异显著($P < 0.05$)。

度呈现不同程度的升高, 成熟期ZHW种群木质部的木质素化程度最高, NBM种群木质部的木质素化程度最低。用Quantifasga法量化后发现, 选用的加拿大一枝黄花3个地理种群茎秆的木质素化差异主要体现在木质部, 且在成熟期ZHW种群的木质部的木质素化程度显著高于NBM种群(图5), 而各种群在生长期有着相似的维管组织木质素化发育情况。这说明Quantifasga法实现了有效测定加拿大一枝黄花生长发育过程中茎秆韧皮部和木质部的木质素化程度的差异, 为进一步探讨木质素化程度与入侵性的关系研究提供技术支持。

本研究中Klason法测得木质素含量的数据显示, 成熟期ZHW种群茎秆的木质素含量与NBM种群相近且均显著低于HM种群(图2-A); TGA法测得木质素含量的数据显示, 成熟期ZHW种群的木质素含量最低(图2-B), 在分析了韧皮部及木质部的木质素化程度后, 得出成熟期ZHW种群木质部的木质素化程度与HM种群相近且显著大于NBM种群(图5)。木质部的较高的木质素化发育说明导管

的水分及无机盐的输导能力更强, 很好的解释了成熟期ZHW种群株高和茎直径均显著大于其他2个地理种群。上述结果说明, 生长发育过程中ZHW种群可以有效地将木质素用于对生长发育最重要的维管组织, 从而使得自身的生长能力强于其他种群。

综合本研究的结果, Klason法与TGA法分别适用于不同特性的木质素含量的测定, 在研究加拿大一枝黄花的入侵机制时, 可以根据不同的生理特性选用不同的木质素含量测定方法。例如, 在比较不同种群加拿大一枝黄花茎秆机械强度和抗逆性时可以选择Klason法。因天敌取食时首先分泌酶液降解木质素, 而 β -O-4型木质素能有效增强茎秆的抗酶解能力, 因此在测定天敌取食对不同种群加拿大一枝黄花茎秆的伤害差异时, 可选用TGA法。Fasga和Quantifasga法的研究结果可以更有效地展现加拿大一枝黄花茎秆韧皮部与木质部的木质素化程度的差异, 这些信息对于深入阐述木质素化对植物的各项生理生化特征的影响有十分重要的帮助, 例如, 木质部的木质素化可以很好的解释植株的生长能力, 而韧皮部的木质素化则可以用于解释植株茎的韧性等生理特性, 这些均可以为研究加拿大一枝黄花的入侵机制提供参考信息。

参考文献(References)

- Abhilasha D, Quintana N, Vivanco J, et al (2008). Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? *J Ecol*, 96: 993–1001
- Barros-Rios J, Santiago R, Malvar RA, et al (2012). Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Anim Feed Sci Technol*, 172: 226–236
- Bellaloui N (2012). Soybean seed phenol, lignin, and isoflavones and sugars composition altered by foliar boron application in soybean under water stress. *Food Nutr Sci*, 3: 579–590
- Blum A (2011). *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. New York: Springer, 11–52
- Brinkmann K, Blaschke L, Polle A (2002). Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. *J Chem Ecol*, 28: 2483–2501
- Casler MD, Jung HG (2006). Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. *Anim Feed Sci Technol*, 125: 151–161

- Fan L, Linker R, Gepstein S, et al (2006). Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiol*, 140: 603–612
- Fenesi A, Geréd J, Meiners SJ, et al (2015). Does disturbance enhance the competitive effect of the invasive *Solidago canadensis* on the performance of two native grasses? *Biol Invasions*, 17: 3303–3315
- Hatfield R, Fukushima RS (2005). Can lignin be accurately measured? *Crop Sci*, 45: 832–839
- Jung HG, Casler MD (2006). Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci*, 46: 1801–1809
- Li J, Liu H, Yan M, et al (2017). No evidence for local adaptation to salt stress in the existing populations of invasive *Solidago canadensis* in China. *PLoS ONE*, 12: e0175252
- Lu JZ, Weng ES, Wu XW, et al (2007). Potential distribution of *Solidago canadensis* in China. *Acta Phytotaxon Sin*, 45: 670–674
- Méchin V, Argillier Q, Rocher F, et al (2005). In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J Agric Food Chem*, 53: 5872–5881
- Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD (1995). Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr Res*, 275: 167–178
- Schwanninger M, Hinterstoisser B (2002). Klason lignin: modifications to improve the precision of the standardized determination. *Holzforschung*, 56: 161–166
- Shimazu S, Ohta M, Ashida H (2014). Application of lipid extracts from *Solidago canadensis* to phytomonitoring of PCB126 in transgenic *Arabidopsis* plants. *Sci Total Environ*, (491–492): 240–245
- Suzuki S, Suzuki Y, Yamamoto N, et al (2009). High-throughput determination of thioglycolic acid lignin from rice. *Plant Biotechnol*, 26: 337–340
- Tolivia D, Tolivia J (1987). Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J Microsc*, 148: 113–117
- Weber E (2001). Current and potential ranges of three exotic goldenrods (*Solidago*) in Europe. *Conserv Biol*, 15: 122–128
- Wilson JR, Mertens DR (1995). Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci*, 35: 251–259
- Xu L, Zhu LF, Tu LL, et al (2011). Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahlia* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot*, 62: 5607–5621
- Zhang CB, Wang J, Qian BY, et al (2009). Effects of the invader *Solidago canadensis* on soil properties. *Appl Soil Ecol*, 43: 163–169
- Zhang S, Zhu W, Wang B, et al (2011). Secondary metabolites from the invasive *Solidago canadensis* L. accumulation in soil and contribution to inhibition of soil pathogen *Pythium ultimum*. *App Soil Ecol*, 48: 280–286
- Zhang Y, Legay S, Barrière Y, et al (2013). Color quantification of stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem. *J Agric Food Chem*, 61: 3186–3192

Methods for determination of stem lignin content and lignification of *Solidago canadensis*

CHANG Chen, CHENG Ji-Liang, QIANG Sheng, SONG Xiao-Ling*, ZHANG Yu*

Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Klason method and thioglycolic acid method (TGA) have been widely used to measure lignin content in plants, in which the former for total lignin content, the latter for the lignin content of β -O-4 mainly. Fasga staining method and Quantifasga method are used to determine lignification in stem. In order to explore whether these methods can be used to determine the stem lignin content and lignification of *Solidago canadensis*, and provide the methods for studying the relationship between stem lignin contents as well as lignification and invasive ability of *S. canadensis*, three populations collected from Nanjing, Nantong and Ningbo were selected as experimental materials. The plant height and stem diameter were measured in growing and mature stages, respectively. The lignin content of stem was determined and lignification in xylem and phloem was analyzed by the above methods. The results showed that the height and stem diameter of population from Nanjing were significantly higher than other two populations in mature stage. The lignin contents had no significant differences among 3 populations in growing stage by Klason and TGA methods, and the lignin contents increased significantly in three populations with growth. In mature stage, population from Nantong had the highest total lignin content. Three populations showed similar stem lignin distribution in growing stage, while population from Nanjing showed a significantly higher lignification of xylem than population from Ningbo in mature stage. These results suggested that both methods of Klason and TGA can be used effectively to determine the lignin content in the stem of *S. canadensis*, and should be chosen based on the experimental aim. Fasga staining method and Quantifasga method can be applied to study on lignification in the stem of *S. canadensis* qualitatively and quantitatively.

Key words: *Solidago canadensis*; lignin; Klason; TGA; Quantifasga

Received 2018-03-01 Accepted 2018-04-23

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200105), the National Natural Science Foundation of China (31401760), and the Profession Scientific Research Special Item of Environmental Public Welfare (201409061).

*Co-corresponding authors: Song XL (sxl@njau.edu.cn), Zhang Y (zhangyu2013@njau.edu.cn).