

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2017.02.010

麝香草酚调控水稻幼苗根的耐盐作用

王婷婷¹, 陈新建², 徐寸发³, 樊友滔⁴, 石志琦⁴, 陈健⁴, 许晓风¹

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏 南京 210023)

(2.深圳市易普乐兴农植保科技有限公司,深圳 518001)

(3.江苏省农业科学院中心实验室,江苏 南京 210014)

(4.江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所,江苏 南京 210014)

[摘要] 外源调控作物耐盐是保证盐渍化土壤中农作物安全生产的重要措施. 新型植物源天然化合物麝香草酚作为一种医药活性物质已有大量报道,但其对植物的生理调控活性却鲜有报道. 本文以水稻幼苗为研究材料,通过植物生理学、组织化学、生物化学等手段,探讨了麝香草酚调控水稻抗盐胁迫的作用方式. 结果显示:(1)外源麝香草酚处理能够显著缓解盐胁迫对水稻幼苗根的抑制,并呈现出一定的浓度效应;(2)外源麝香草酚处理显著缓解了盐胁迫诱导的根尖细胞死亡效应;(3)外源麝香草酚处理有效清除了盐胁迫诱导根尖过量累积的过氧化氢和超氧阴离子;(4)盐胁迫显著抑制根尖超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,而添加麝香草酚则显著提升了盐胁迫下这两种抗氧化酶的活力;(5)外源麝香草酚处理显著提高了盐胁迫下根尖抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)的含量. 这些结果表明,麝香草酚能够通过提升水稻幼苗根尖的抗氧化能力,抵御盐胁迫诱导的氧化损伤和细胞死亡效应. 本研究对盐渍化土壤中水稻的安全生产提供了重要的科学依据和技术手段.

[关键词] 水稻,麝香草酚,盐胁迫,活性氧,细胞死亡

[中图分类号]S634.3 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1001-4616(2017)02-0057-08

Thymol Modulates Salt Tolerance in the Root of Rice Seedling

Wang Tingting¹, Chen Xinjian², Xu Cunfa³, Fan Youtao⁴, Shi Zhiqi⁴, Chen Jian⁴, Xu Xiaofeng¹

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.Shenzhen Yipule Xingnong Plant Protection Co. Ltd., Shenzhen 518001, China)

(3.Central Laboratory, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

(4.Institute of Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: Exogenous regulation of salt tolerance is an important approach for the safety of crop production in salinity soil. Thymol is a novel plant-derived natural compound, which has been extensively reported to have medicinal activity. However, the regulation of plant physiology by thymol is still elusive. In the present study, physiological, histochemical, and biochemical methods were used to investigate thymol-modulated salt tolerance in rice seedlings. Basically, the results showed that, (1) Exogenous treatment with thymol significantly attenuated salt-induced root inhibition in a dose-dependent manner. (2) Exogenous treatment with thymol remarkably blocked salt-induced cell death in root tip. (3) Exogenous treatment with thymol scavenged the over-generated hydrogen peroxide and superoxide radical in root tip under salt stress. (4) Salt stress significantly inhibited the activity of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) in root tip, while thymol treatment pronouncedly enhance the activity of these two anti-oxidative enzymes under salt stress. (5) Exogenous treatment with thymol induced significant increase in the content of ascorbic acid(AsA) and glutathione(GSH) in root tip under salt stress. These results suggested that thymol was capable of conferring salt-induced oxidative injury and cell death by enhancing the anti-oxidative capacity in the root tip of rice seedlings. The current study provides important technological and scientific basis to ensure the safety of crop production in salinity soil.

Key words: rice, thymol, salt stress, reactive oxygen species, cell death

收稿日期:2016-09-07.

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2096].

通讯联系人:许晓风,教授,研究方向:生理生化调控. E-mail:xuxiaofeng@njnu.edu.cn

全世界大约20%农业用地的盐渍化程度在不断加重,预计到2050年,将会有超过50%的耕地盐碱化^[1]。盐胁迫严重危害作物生长。水稻作为重要的粮食作物之一,属于盐敏感作物,其生长发育在盐渍化土壤中严重受阻^[2]。盐渍化土壤的综合治理方式有多种,但由于周期、成本等因素难以大面积实施;培育耐盐作物品种周期较长,不足以应对目前土壤盐渍化的速度和程度^[3]。随着作物响应盐胁迫研究的不断深入,通过外源化合物调控作物对盐胁迫的抗性已逐渐成为可能的理想替代手段。大量研究表明,盐胁迫能够诱导作物体内活性氧累积、氧化损伤、代谢失衡等,进而导致细胞死亡并抑制作物生长^[4-5]。而这些典型的盐胁迫损伤生理生化指标亦可作为作物抗盐程度的重要评价标准^[5]。

麝香草酚(Thymol),又名百里香酚,化学名是2-异丙基-5-甲基苯酚,是一种单萜酚,主要存在于唇形科百里植物中,是百里香属植物挥发油的主要成分^[6]。在医学研究中,麝香草酚作为抗氧化剂、自由基清除剂、抗脂质过氧化剂^[7-9],表现出良好的抑菌、抗病毒、抗肿瘤、消炎活性^[10-14]。作为防腐剂和食品添加剂,麝香草酚在食品行业亦得到广泛应用^[15-16]。鉴于其安全性和广谱的生物活性,欧盟委员会已批准麝香草酚作为安全的植保产品在市应用^[17]。而我们的前期研究结果显示,麝香草酚对西瓜枯萎病有良好的防效^[18],并且对禾谷镰孢菌具有良好的抑菌效应^[19]。另外,前期将麝香草酚开发为生物农药并在田间实际应用中发现,麝香草酚对植物的生长具有一定的调控作用。目前,麝香草酚的活性研究主要针对哺乳动物和微生物,其对植物生理过程的调控研究鲜有报道。本文探讨了麝香草酚调控水稻幼苗抗盐胁迫的作用方式,旨在为拓展麝香草酚这一新型生物农药的功能和田间使用技术开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试水稻品种为南粳9108(由江苏省农科院粮食作物研究所馈赠)。采用NaCl对水稻幼苗根进行盐胁迫处理。麝香草酚(纯度99%,购自Sigma-Aldrich公司)(在本研究的图中简称为Thy),先配成100 mmol/L母液,4℃避光保存,使用时按所需浓度稀释;谷胱甘肽荧光探针(Monochlorobimane)购自Invitrogen公司;生理生化测定相关试剂和试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻幼苗培养与处理

挑选颗粒饱满的种子,经过1% NaCl消毒10 min后,用单蒸水冲洗5次,在30℃条件下避光浸泡48 h。挑选露白一致的种子将其摆在直径为15 cm的培养皿中,培养条件为28℃,光照周期为16 h/8 h(光/暗),光照强度300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$,相对湿度为75%。待根长为1 cm左右时,选取健壮均一的幼苗进行根部处理,每个处理30棵幼苗。

首先,采用不同浓度的NaCl溶液(0、25、50、100、150) mmol/L处理水稻幼苗根部3 d,测定根长。根据根长测定的结果,选取最适的NaCl浓度(100 mmol/L)进行后续实验。然后利用麝香草酚处理受NaCl胁迫的幼苗根部,设置6个处理组分别为:对照(CK)、NaCl(100 mmol/L)、NaCl(100 mmol/L)+Thy(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、NaCl(100 mmol/L)+Thy(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、NaCl(100 mmol/L)+Thy(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、NaCl(100 mmol/L)+Thy(40 $\mu\text{mol}/\text{L}$),处理3 d,测定根长。根据根长测定的结果,选取能够缓解NaCl胁迫的最适Thymol浓度(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$),进行4个组合处理:CK、NaCl(100 mmol/L)、NaCl(100 mmol/L)+Thy(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Thy(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$),处理3 d后用于后续的生理生化测定。

1.2.2 水稻幼苗根尖细胞死亡检测原位染色

采用Trypan blue法对根系细胞死亡进行特异性染色^[20]。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗3次后,用Trypan blue试剂染色5 min,去离子水冲洗3次,体视显微镜(SteREO Discovery.V8, ZEISS)下观察并拍照。

1.2.3 水稻幼苗根尖过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)原位染色

过氧化氢组织染色参照Orozco-Cárdenas^[21]的方法。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗3次后,放置于浓度为1 g/L的DAB(3,3-diaminobenzidine)溶液中染色10 min,吸收到根内的DAB与过氧化氢反应呈现棕黄色,去离子水冲洗3次,体视显微镜下观察并拍照。

超氧阴离子组织染色参照Yamamoto^[22]的方法。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗3次后,放置

于浓度为 6 mmol/L 的 NBT(nitro blue tetrazolium) 溶液中光照染色 10 min,吸收到根内的 NBT 与超氧阴离子反应呈现深蓝色,去离子水冲洗 3 次,体视显微镜下观察并拍照。

1.2.4 水稻幼苗根尖谷胱甘肽(GSH)原位染色

谷胱甘肽组织染色参照 Liso 等^[23]的方法。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗 3 次后,放置于浓度为 100 μ mol/L 的特异性荧光探针 monochlorobimane 溶液中避光染色 30 min,吸收到根内的 monochlorobimane 与谷胱甘肽反应生成 GS-bimane,能够在激发波长 390 nm/发射波长 478 nm 处产生绿色荧光。采用荧光电子显微镜(ECLIPSE,TE2000-S,Nikon)观察并拍照,用 Image-Pro Plus 6.0(Media Cybernetics,Inc.)软件分析 GS-bimane 相对荧光密度来反应 GSH 的相对含量。

1.2.5 水稻幼苗根尖抗氧化酶活性测定

抗氧化酶活性测定参照 Xue 等^[24]和 Chen 等^[25]的方法。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗 3 次,称取根尖样品(1 cm)0.5 g,加入 5 mL 预冷的 50 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液(内含 1%聚乙烯吡咯烷酮),冰浴研磨,4 $^{\circ}$ C 下 10 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。超氧化物歧化酶(SOD)测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定,3 mL 反应体系:磷酸缓冲液(50 mmol/L,pH 7.8),13 mmol/L 蛋氨酸,2 μ mol/L 核黄素,75 μ mol/L NBT,0.1 mmol/L EDTA,30 μ L 酶液。日光灯下反应 30 min 后,测定 560 nm 处吸光值,抑制 NBT 光化还原的 50%为一个 SOD 活性单位(U)。过氧化物酶(POD)测定采用愈创木酚法,1.5 mL 反应体系包括磷酸缓冲液(100 mmol/L,pH 7.8),7.2 mmol/L 愈创木酚,1%(质量体积比)过氧化氢,20 μ L~30 μ L 酶液。加入酶液开始反应,立即记录 470 nm 处吸光值,以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 作为一个 POD 活性单位(U)。过氧化氢酶(CAT)采用过氧化氢法测定,50 μ L 酶液加入到含有 0.1%(质量体积比)过氧化氢的磷酸缓冲液中(50 mmol/L,pH 7.0)开始反应,立即记录 240 nm 处吸光值的变化,以每分钟内 A_{240} 变化 0.01 为一个 CAT 活性单位(U)。测定并计算所有酶活性除以相应样品中的蛋白含量得出比活力。酶液中的蛋白质含量测定采用 Bradford 方法(考马斯亮蓝 G250 染色法),以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[26]。

1.2.6 水稻幼苗根尖抗坏血酸(AsA)含量测定

根据 Chen 等^[25]的方法测定抗坏血酸含量。将处理后的水稻幼苗根用去离子水冲洗 3 次,称取根尖样品(1 cm)0.1 g,加入含 1 mL 预冷的 5%(w/v)偏磷酸冰浴研磨,10,000 rpm 离心 10 min,取 0.5 mL 上清液,20 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液测定抗坏血酸含量。反应体系:0.3 mL 植物提取液,0.75 mL 磷酸缓冲液(150 mmol/L,pH 7.4,5 mmol/L EDTA),0.5 mL DTT(10 mmol/L)。混匀后室温放置 10 min,加入 0.15 mL 0.5%(w/v)N-ethylmaleimide 以除去多余的 DTT。然后依次加入 0.6 mL 10%(w/v)TCA,0.6 mL 44%(w/v) orth-phosphoric acid,0.6 mL 4%(w/v) α , α' -dipyridyl(溶解于 70%(v/v)酒精中),25 μ L 10%(w/v) $FeCl_3$ 。充分混匀,40 $^{\circ}$ C 水浴加热 40 min 后,测定 525 nm 吸光值。同时制作 0 μ g/mL~100 μ g/mL 范围内的 AsA 标准曲线,用于计算样品中的抗坏血酸含量。

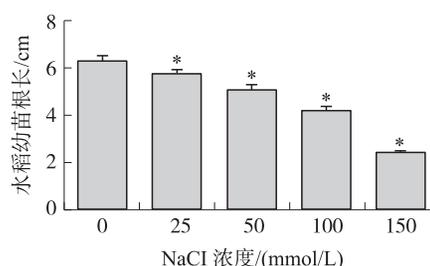
1.3 数据统计分析

结果采用 3 次重复的(平均值 \pm 标准差)表示,首先采用 SPSS 2.0 对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA),然后通过最小显著性差异法(LSD)进行 F 检验检测任意两组处理之间在 $P<0.05$ 水平的差异显著性。图中的星号(*)表示处理与对照之间在 $P<0.05$ 水平差异显著,而不同小写字母表示任意两组处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著。

2 结果

2.1 NaCl 处理对水稻幼苗根生长的影响

NaCl 处理对水稻幼苗根生长的抑制作用呈剂量相关效应。如图 1 所示,水稻幼苗根部在 0 mm、25 mm、50 mm、100 mm、150 mm 的 NaCl 溶液中处理 3 d 后,幼苗根长与对照(CK)相比分别减少了 8.36%、19.35%、33.23%、61.56%。由于用 25 mmol/L 和 50 mmol/L 的 NaCl 溶液处理幼苗根长时抑制地较轻,而 150 mmol/L 的 NaCl 溶液处理幼苗根长时幼苗几乎停止生长,因此后续实验采用 100 mmol/L 的 NaCl 处理进行进一步研究。



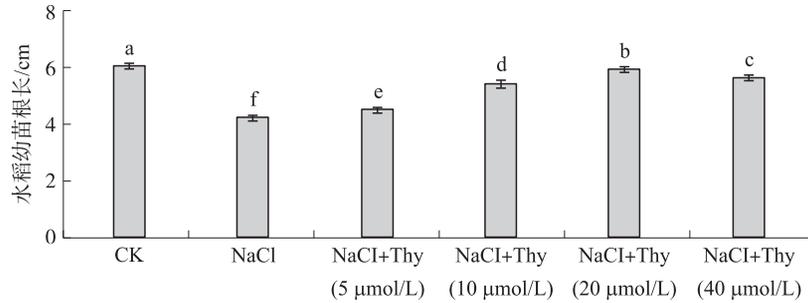
* 表示处理与对照之间在 $P<0.05$ 水平差异显著

图 1 NaCl 处理对水稻幼苗根长的影响

Fig. 1 The effect of NaCl treatment on the root growth of rice seedlings

2.2 麝香草酚处理对盐胁迫下水稻幼苗根长的影响

盐胁迫明显抑制水稻幼苗根的生长. 如图 2 所示, 单独 100 mmol/L 的 NaCl 处理后根长比对照(CK)显著下降了 30.48%, 而加入麝香草酚后才能够缓解 NaCl 的胁迫效应. 100 mmol/L 的 NaCl 与不同浓度的麝香草酚(5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$) 共处理后, 水稻幼苗根长分别比单独 NaCl (100 mmol/L) 处理增加了 6.87%、28.67%、40.76%、33.89%. 其中 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚缓解效果最好, 其与 NaCl 共处理的根长接近于对照水平. 因此, 后续实验采用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚进行处理.



不同小写字母表示处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著

图 2 麝香草酚对盐胁迫下水稻幼苗根长的影响

Fig. 2 The effect of thymol on the root growth of rice seedlings under salt stress

2.3 麝香草酚处理对盐胁迫下水稻幼苗根尖细胞死亡和活性氧累积的影响

作为细胞死亡的特异性染料, Trypan blue 能够穿透破损的细胞膜将死亡细胞染成蓝色, 而不能对健康活细胞进行染色. 如图 3 所示, 对照条件下的水稻幼苗根尖被轻微染色, 说明根在正常的生长发育过程中存在自然的细胞死亡代谢过程. NaCl 处理后, 根尖染色明显加重, 说明盐胁迫导致了根尖细胞死亡加剧. 而 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理后, 细胞死亡现象得到明显缓解. 单独麝香草酚处理对根尖细胞死亡无显著影响.

盐胁迫通常导致植物细胞内活性氧的过量累积. 过氧化氢 (H_2O_2) 和超氧阴离子 (O_2^-) 是细胞内两种常见的活性氧分子. 通过采用 DAB 和 NBT 对水稻幼苗根尖的 H_2O_2 和 O_2^- 进行原位染色(图 4). 结果显示, 与对照相比, 单独 NaCl 处理诱导根尖 H_2O_2 和 O_2^- 的大量产生; 与单独 NaCl 处理相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理后, H_2O_2 和 O_2^- 的水平则显著降低, 几乎恢复到对照水平. 单独麝香草酚处理对根尖 H_2O_2 和 O_2^- 的含量无显著影响. 这些结果说明, 麝香草酚能够有效抑制盐胁迫下水稻幼苗根尖活性氧的大量累积.



图 3 麝香草酚在盐胁迫下对水稻幼苗根尖细胞死亡的影响

Fig. 3 The effect of thymol on cell death of the root tip of rice seedlings under salt stress

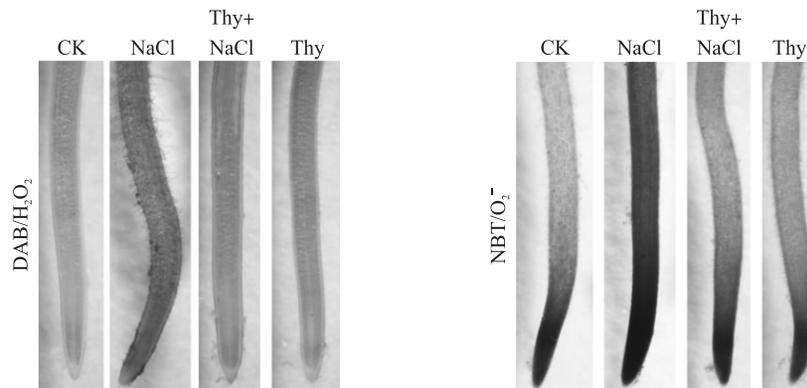
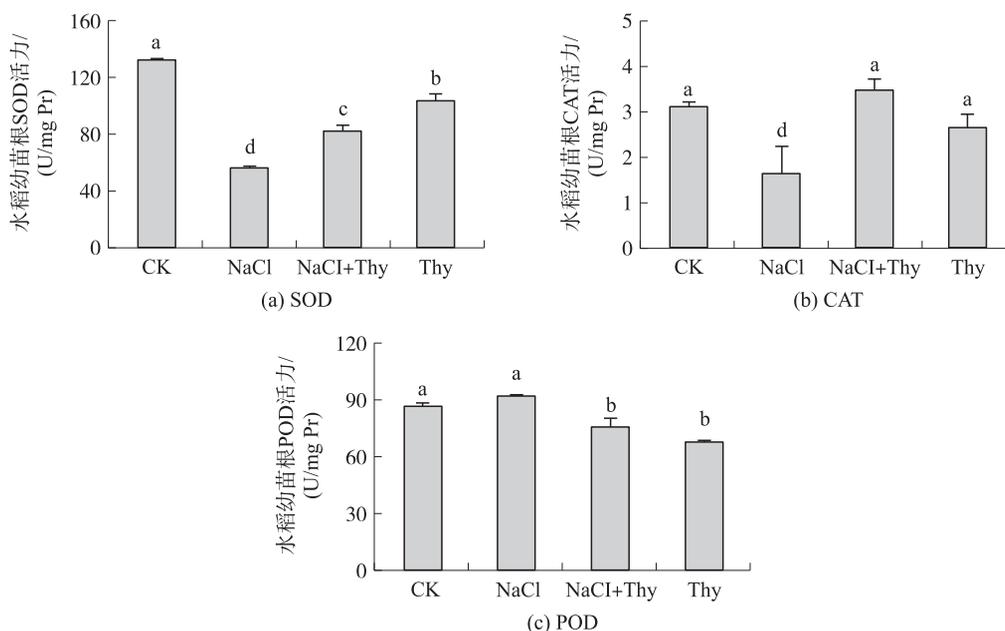


图 4 麝香草酚在盐胁迫下对水稻幼苗根尖活性氧累积的影响

Fig. 4 The effect of thymol on ROS accumulation in the root tip of rice seedlings under salt stress

2.4 麝香草酚处理对盐胁迫下水稻幼苗根尖抗氧化酶活力的影响

植物细胞内的酶促氧化系统在清除过量活性氧方面发挥巨大作用. 本研究结果显示,与对照相比,单独 NaCl 处理导致水稻幼苗根尖 SOD 活力显著下降;而 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理后,SOD 活力较单独 NaCl 处理显著回升(图 5A),CAT 活力与 SOD 表现出相似的变化趋势(图 5B). 单独 NaCl 处理显著抑制根尖 CAT 活力,而加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚后,CAT 活力则显著回升,恢复到对照水平. 对于 POD 活力,对照和单独 NaCl 处理之间无显著差异;而麝香草酚加 NaCl 和单独麝香草酚处理却略微下降(图 5C). 这些结果说明麝香草酚能够显著缓解盐胁迫对水稻幼苗根尖 SOD 和 CAT 活力的抑制效应.



不同小写字母表示处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著

图 5 麝香草酚对盐胁迫下水稻幼苗根尖抗氧化酶活力的影响

Fig. 5 The effect of thymol on the activity of anti-oxidative enzymes in the root tip of rice seedlings under salt stress

2.5 麝香草酚处理对盐胁迫下水稻幼苗根尖 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA 和 GSH 作为植物体内两种重要的抗氧化物质,是抗氧化系统的重要组成部分. 本研究结果显示,单独 NaCl 处理对水稻幼苗根尖 AsA 含量无显著影响. 与单独 NaCl 处理相比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理的根尖 AsA 含量显著提升了 37.96%(图 6).

通过特异性荧光标记水稻幼苗根尖 GSH,结果显示,与对照相比,单独 NaCl 处理的根尖 GSH 绿色荧光亮度变强,而 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理的根尖 GSH 绿色荧光亮度更强(图 7A). 通过统计 GSH 绿色荧光密度来反应 GSH 的相对含量,发现单独 NaCl 处理的根尖 GSH 荧光密度比对照增加了 52.45%;而 20 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香草酚与 NaCl 共处理后,GSH 荧光密度比对照增加了 106.43%(图 7B). 这些结果说明,麝香草酚处理能够显著提高盐胁迫下水稻幼苗根尖 AsA 和 GSH 的含量.

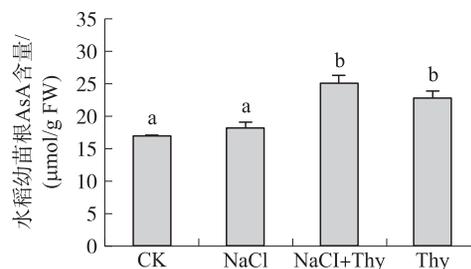
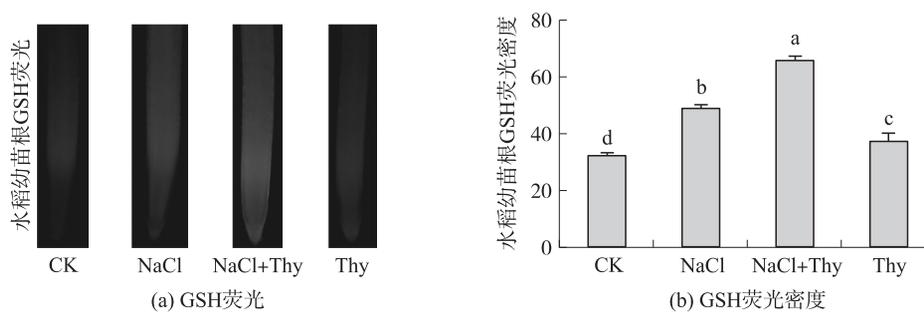


图 6 麝香草酚对盐胁迫下水稻幼苗根尖 AsA 含量的影响

Fig. 6 The effect of thymol on AsA content in the root tip of rice seedlings under salt stress

3 讨论

植物体内过量活性氧累积造成的氧化损伤是盐胁迫的典型特征之一^[5]. 本研究结果显示,盐胁迫诱导的水稻幼苗根尖抗氧化酶活性降低,导致了活性氧的大量累积,进而诱发了根尖细胞死亡效应. 而麝香草酚则能够通过提升水稻根尖的抗氧化能力,进而有效清除过量累积的活性氧,缓解盐胁迫诱导的细胞死亡和根长抑制效应.



不同小写字母表示处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著

图 7 麝香草酚对盐胁迫下水稻幼苗根尖 GSH 含量的影响

Fig. 7 The effect of thymol on GSH content in the root tip of rice seedlings under salt stress

植物进化形成了酶促和非酶促抗氧化系统来抵抗氧化胁迫^[27]。酶促抗氧化系统主要由几个抗氧化酶组成,其中 SOD 广泛存在于细胞中的各个亚细胞器中,通过催化 O_2^- 的歧化反应,将 O_2^- 转化成毒性偏低的 H_2O_2 。因此,SOD 构成了酶促抗氧化系统中的第一道防御屏障^[28]。在本研究中,麝香草酚处理后 O_2^- 含量的下降可能源自于 SOD 活力的显著上升。抗氧化酶 CAT 和 POD 负责还原 H_2O_2 为无毒的水分子,从而缓解过量 H_2O_2 对植物组织的毒害^[27]。本研究结果表明,麝香草酚通过刺激 CAT 而非 POD 来清除盐胁迫下水稻幼苗根尖过量累积的 H_2O_2 。在非酶促抗氧化系统中,AsA 和 GSH 除了本身能够直接与活性氧发生反应以外,AsA-GSH 代谢循环同样能够高效清除植物细胞内的活性氧^[27]。盐胁迫下,麝香草酚处理能够显著提升水稻幼苗根尖 AsA 和 GSH,进而作用于活性氧的清除。植物细胞内过量产生的活性氧能够攻击核酸、蛋白质、脂类等大分子,是诱导细胞死亡的重要因素之一^[29]。而根尖是植物根系伸长生长的关键区域^[30]。因此,盐胁迫下,麝香草酚清除盐胁迫诱导的过量活性氧,有助于缓解根尖细胞死亡和根长抑制效应。

有研究表明,麝香草酚本身亦能够通过直接与多种活性氧分子(包括 O_2^- 和 H_2O_2)发生反应^[31]。这说明,在盐胁迫下水稻幼苗根中,麝香草酚除了刺激水稻的抗氧化系统以外,本身也可能直接参与清除活性氧,从而综合表现出高效的抗氧化活性。有报道显示,麝香草酚能够显著提高哺乳动物细胞的抗氧化能力。例如:麝香草酚能够提高四氯化碳胁迫下大鼠肝脏细胞的 SOD 活力^[32];麝香草酚通过提高小鼠红细胞内 SOD、CAT、GSH 水平来抵御铬胁迫^[33];麝香草酚能够提高人体肝癌细胞内 SOD、CAT、GSH 水平来缓解汞胁迫引起的细胞毒害效应^[34];麝香草酚通过提升人体肝脏细胞 GSH 水平来清除活性氧并抑制氧化损伤^[35]。结合本研究中麝香草酚能够提升盐胁迫下水稻幼苗根尖 SOD、CAT、GSH 水平的结果,可以推论,在提升细胞抗氧化能力抵御外界环境胁迫方面,麝香草酚可能更倾向于通过刺激 SOD、CAT、GSH。另外,在 AsA-GSH 代谢循环中,GSH 参与 AsA 氧化态的酶促转化^[36]。本研究中,麝香草酚诱导产生的 GSH 是否有助于 AsA 的产生,从而放大麝香草酚的抗氧化效应? 这还需要进一步地详细研究。

总之,本研究首次明确了麝香草酚在调控植物生理方面的功能。继续深入揭示麝香草酚调控作物耐盐胁迫的分子机理,不但能够拓展麝香草酚的生理功能,同时也为生物干预盐渍化土壤中农作物的安全生产提供重要的理论依据。

[参考文献]

[1] VINOCUR B,ALTMAN A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress; achievements and limitations[J]. Current opinion in biotechnology,2005,16(2):123-132.
 [2] 孙伟,郑崇珂,解丽霞,等. 水稻对盐胁迫的生理和分子反应研究进展[J]. 山东农业科学,2016,48(4):148-153.
 [3] 陈绍荣,邵建华,王喜江,等. 我国土壤盐渍化的综合治理[J]. 化肥工业,2013,40(5):65-69.
 [4] HOSSAIN M A, HASANUZZAMAN M, FUJITA M. Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean[J]. Frontiers of agriculture in China, 2011,5(1):1-14.
 [5] MAHAJAN S,TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview[J]. Archives of biochemistry and biophysics,

- 2005,444(2):139-158.
- [6] BENSMIRA M,JIANG B,NSABIMANA C,et al. Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures[J]. Food research international,2007,40(3):341-346.
- [7] AESCHBACH R,LOLIGER J,SCOTT B C,et al. Antioxidant actions of thymol,carvacrol,6-gingerol,zingerone and hydroxytyrosol[J]. Food and chemical toxicology,1994,32(1):31-36.
- [8] KRUK I,MICHALSKA T,LICHSZTELD K,et al. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species[J]. Chemosphere,2000,41(7):1 059-1 064.
- [9] ALAM K,NAGI M N,BADARY O A,et al. The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice[J]. Pharmacological research,1999,40(2):159-163.
- [10] IPEK E,TUYLU B A,ZEYTIINOGLU H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures [M]//Animal cell technology:basic and applied aspects. Netherlands:Springer,2003:471-474.
- [11] BENARFA A,COMBENS S,PREZIOSI-BELLOY L,et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure[J]. Letters in applied microbiology,2006,43(2):149-154.
- [12] KARKABOUNAS S,KOSTOULA O K,DASKALOU T,et al. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol[J]. Exp oncol,2006,28(2):121-125.
- [13] DANDLEN S A,LIMA A S,MENDES M D,et al. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils[J]. Flavour and fragrance journal,2010,25(3):150-155.
- [14] SAAD A,FADLI M,BOUAZIZ M,et al. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol[J]. Phytomedicine,2010,17(13):1 057-1 060.
- [15] NAVARRO D,DIAZ-MULA H M,GUILLEN F,et al. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol[J]. International journal of food microbiology,2011,151(2):241-246.
- [16] CASTILLO S,PEREZ A C O,Martínez R D,et al. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage[J]. Food control,2014,35(1):132-136.
- [17] 中国香料香精化妆品协会. 欧盟批准百里香酚用作植保产品[J]. 国内外香化信息,2013(7):21.
- [18] 张猛,陈健,薛延丰,等. 植物源化合物百里香酚对西瓜枯萎病菌的抑菌机制初探[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):1 019-1 024.
- [19] GAO T,ZHOU H,ZHOU W,et al. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis[J]. Molecules,2016,21(6):770.
- [20] DUAN Y,ZHANG W,Li B,et al. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*[J]. New phytologist,2010,186(3):681-695.
- [21] OROZCO C M,RYAN C A. Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway[J]. Proceedings of the national academy of sciences,1999,96(11):6 553-6 557.
- [22] YAMAMOTO Y,KOBAYASHI Y,MATSUMOTO H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum,but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots[J]. Plant physiology,2001,125(1):199-208.
- [23] LISO R,DE TULLIO M C,CIRACI S,et al. Localization of ascorbic acid,ascorbic acid oxidase,and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L[J]. Journal of experimental botany,2004,55(408):2 589-2 597.
- [24] XUE Y F,LIU L,LIU Z P,et al. Protective role of Ca against NaCl toxicity in Jerusalem artichoke by up-regulation of antioxidant enzymes[J]. Pedosphere,2008,18(6):766-774.
- [25] CHEN J,SHIYAB S,HAN F X,et al. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*[J]. Ecotoxicology,2009,18(1):110-121.
- [26] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical biochemistry,1976,72(1/2):248-254.
- [27] GILL S S,TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant physiology and biochemistry,2010,48(12):909-930.
- [28] ALSCHER R G,ERTURK N,HEATH L S. Role of superoxide dismutases(SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. Journal of experimental botany,2002,53(372):1 331-1 341.
- [29] VAN B F,DAT J F. Reactive oxygen species in plant cell death[J]. Plant physiology,2006,141(2):384-390.
- [30] DUPUY L,GREGORY P J,BENGOUGH A G. Root growth models:towards a new generation of continuous approaches[J].

- Journal of experimental botany,2000,61:2 131-2 143.
- [31] KRUK I, MICHALSSKA T, LICHSZTEDLD K, et al. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species[J]. Chemosphere,2000,41(7):1 059-1 064.
- [32] AL-MALKI A L. Antioxidant properties of thymol and butylated hydroxytoluene in carbon tetrachloride-induced mice liver injury[J]. Journal of king abdulaziz university-science,2010,22:239-248.
- [33] ABD-ELHAKIM Y M, MOHAMED W A M. Assessment of the role of thymol in combating chromium(VI)-induced oxidative stress in isolated rat erythrocytes *in vitro*[J]. Toxicological and environmental chemistry,2016,98(10):1-14.
- [34] SHETTIGAR N B, DAS S, RAO N B, et al. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells[J]. Environmental toxicology,2015,30(8):968-980.
- [35] KIM Y S, HWANG J W, KANG S H, et al. Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells[J]. Journal of natural medicines,2014,68(1):154-162.
- [36] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in plant science,2002,7(9):405-410.

[责任编辑:黄敏]

(上接第56页)

- [15] RATHI C, MEIBOHM B. Clinical pharmacology of bispecific antibody constructs[J]. The journal of clinical pharmacology,2015,55(S3):S21-S28.
- [16] MORECKI S, LINDHOFER H, YACOVLEV E, et al. Induction of long-lasting antitumor immunity by concomitant cell therapy with allogeneic lymphocytes and trifunctional bispecific antibody[J]. Experimental hematology,2008,36(8):997-1003.
- [17] XIE Z, NING G, MING Y, et al. A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis[J]. Journal of immunological methods,2005,296(1/2):95-101.
- [18] GUETTINGER Y, BARBIN K, PEIPP M, et al. A recombinant bispecific single-chain fragment variable specific for HLA class II and Fc α RI(CD89) recruits polymorphonuclear neutrophils for efficient lysis of malignant B lymphoid cells[J]. The journal of immunology,2010,184(3):1 210-1 217.
- [19] BRUENKE J, BARBIN K, KUNERT S, et al. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and Fc γ RIII(CD16)[J]. British journal of haematology,2005,130(2):218.
- [20] ZHANG L, HOU Y, ZHANG J, et al. Cytotoxicity of cytokine-induced killer cells targeted by a bispecific antibody to gastric cancer cells[J]. Oncology letters,2013,5(6):1 826-1 832.

[责任编辑:黄敏]