

## 研究报告

## 根瘤菌 PP3 对水黄皮抗氧化系统应激镍胁迫的影响

金芮民<sup>1</sup>, 郝思迪<sup>1</sup>, 董官勇<sup>3</sup>, 严靖<sup>1</sup>, 程曦冉<sup>1</sup>, 陈强<sup>1,2</sup>, 余秀梅<sup>\*1,2</sup>

1 四川农业大学资源学院, 四川 成都 611130

2 自然资源部成都平原国土生态与土地利用野外科学观测研究站, 四川 成都 611130

3 苍溪县猕猴桃产业发展局, 四川 广元 628499

金芮民, 郝思迪, 董官勇, 严靖, 程曦冉, 陈强, 余秀梅. 根瘤菌 PP3 对水黄皮抗氧化系统应激镍胁迫的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1626-1640.

JIN Ruimin, HAO Sidi, DONG Guanyong, YAN Jing, CHENG Xiran, CHEN Qiang, YU Xiumei. Effect of *Rhizobium* sp. PP3 on the antioxidant system of *Pongamia pinnata* under nickel stress[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1626-1640.

**摘要:** 【背景】抗氧化系统在植物抵抗逆境胁迫中起着重要作用, 而共生根瘤菌是否会影响豆科植物抗氧化防御系统来提高植株抗逆性尚不清楚。【目的】以耐逆性强的水黄皮(*Pongamia pinnata*)作为豆科植物代表, 开展镍胁迫下的水黄皮快生根瘤菌(*Rhizobium* sp.) PP3 回接水黄皮的盆栽实验, 探究根瘤菌共生固氮对豆科植物抗氧化系统应激镍胁迫的影响。【方法】利用酶联免疫法测定不同处理下水黄皮根、茎、叶中的 4 种抗氧化酶活性和 4 种非酶抗氧化剂含量。【结果】水黄皮植株中的抗氧化酶活性强弱为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)>过氧化物酶(peroxidase, POD)>过氧化氢酶(catalase, CAT)>谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR), 非酶抗氧化剂含量高低为谷胱甘肽(glutathione, GSH)>类黄酮(flavonoids, FLA)>原花青素(oligomeric proantho cyanidins, OPC)>抗坏血酸(ascorbic acid, AsA); 在不施用氮素和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>胁迫处理下, 接种根瘤菌 PP3 使水黄皮茎中的 POD 活性增加 61.8%, 叶中的 SOD、GR 和 CAT 活性增加 5.7%、23.6%和 36.1%; 在施用氮素和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>胁迫下, 接种根瘤菌 PP3 使水黄皮植株根中 GSH、FLA 和 OPC 含量升高 55.9%、61.6%和 38.6%, 水黄皮植株叶中 GSH 含量升高 14.8%。【结论】本研究初步揭示了根瘤菌会对水黄皮组织中的抗氧化酶和非酶抗氧化剂产生显著影响, 但对不同组织中抗氧化酶和抗氧化剂的影响不同, 说明根瘤菌通过介导水黄皮抗氧化防御系统来应激镍胁迫, 其在镍污染土壤中强化水黄皮的抗逆性有着重要的作用。

**关键词:** 根瘤菌; 镍; 水黄皮; 抗氧化酶; 非酶抗氧化剂

资助项目: 四川省科技成果转化示范项目(2022ZHCG0030); 成都市科技项目(2023-YF08-00004-SN); 德阳市重点研发项目(2022NZ015)

This work was supported by the Demonstration Project of Transfer and Transformation of Scientific and Technological Achievements in Sichuan Province (2022ZHCG0030), the Chengdu Science and Technology Project (2023-YF08-00004-SN), and the Deyang Key Research and Development Program (2022NZ015).

\*Corresponding author. E-mail: xiumeiyu@sicau.edu.cn

Received: 2023-08-30; Accepted: 2023-11-20; Published online: 2024-01-12

## Effect of *Rhizobium* sp. PP3 on the antioxidant system of *Pongamia pinnata* under nickel stress

JIN Ruimin<sup>1</sup>, HAO Sidi<sup>1</sup>, DONG Guanyong<sup>3</sup>, YAN Jing<sup>1</sup>, CHENG Xiran<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>1,2</sup>, YU Xiumei<sup>\*1,2</sup>

1 College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Observation and Research Station of Land Ecology and Land Use in Chengdu Plain, Ministry of Natural Resources, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Cangxi Kiwifruit Industry Development Bureau, Guangyuan 628499, Sichuan, China

**Abstract: [Background]** The antioxidant system plays an important role in plant tolerance to stress, and whether rhizobia affect the antioxidant system of legumes to improve plant tolerance to stress remains unclear. **[Objective]** *Pongamia pinnata* with strong stress tolerance was selected as the representative of legumes in this study, and the pot experiments of inoculating *Rhizobium* sp. PP3 to *P. pinnata* under nickel stress were performed. **[Methods]** The activities of four antioxidant enzymes and the content of four non-enzymatic antioxidants in the roots, stems and leaves of *P. pinnata* in different treatments were determined by the enzyme linked immunosorbent assay. **[Results]** The activities of antioxidant enzymes in *P. pinnata* followed the trend of superoxide dismutase (SOD)>peroxidase (POD)>catalase (CAT)>glutathione reductase (GR), and the content non-enzymatic antioxidants was in the order of glutathione (GSH)>flavonoid (FLA)>oligomeric proantho cyanidins (OPC)>ascorbic acid (AsA). In the case of no nitrogen supply and 40 mg/L Ni<sup>2+</sup> stress, *Rhizobium* sp. PP3 increased the POD activity in the stems by 61.8%, and the SOD, GR, and CAT activities in the leaves by 5.7%, 23.6%, and 36.1%, respectively. Under the stress of nitrogen and 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>, *Rhizobium* sp. PP3 increased the content of GSH, FLA, and OPC in the roots by 55.9%, 61.6%, and 38.6%, respectively, and the GSH content in the leaves by 14.8% under the stress of 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>. **[Conclusion]** Rhizobia had significant effects on the four antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants in *P. pinnata*, while the effects on antioxidant enzymes and antioxidants varied in different tissues. The results indicate that rhizobia regulate the antioxidant system of *P. pinnata* in response to nickel stress, and they play a role in strengthening the stress tolerance of *P. pinnata* in the nickel-contaminated soil.

**Keywords:** rhizobia; nickel; *Pongamia pinnata*; antioxidant enzymes; non-enzymatic antioxidants

根据生态环境部、自然资源部 2014 年发布的《全国土壤污染状况调查公报》<sup>[1]</sup>显示,我国土壤环境状况总体不容乐观,镍(Ni)污染土壤点位超标率达 4.8%。镍作为土壤污染的重金属之一,是许多高等植物体内所必需的微量元素,在植物生长代谢中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。低浓度的 Ni 能促进植物种子和幼苗生长,但超过一定浓度将

会抑制植物生长<sup>[3]</sup>,导致植物细胞膜损伤、活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累、叶片黄化,严重时能使植物死亡<sup>[4]</sup>。强毒性的重金属还能通过土壤-作物系统侵入人体<sup>[5]</sup>,严重影响人体正常代谢<sup>[6]</sup>,增加肾脏、膀胱、肝脏等癌症风险<sup>[7]</sup>。

ROS 是由氧分子(O<sub>2</sub>)衍生而来的一类自由基、活性分子和离子的总称,作为植物有氧代

谢的副产物,其活性和毒性都很高<sup>[8]</sup>。当 ROS 积累过量时可导致脂质过氧化,损害细胞膜结构,从而对植物产生毒害<sup>[9]</sup>。而植物可以通过其自身的抗氧化系统有效清除过量的 ROS 或代谢氧化类物质,维持植物机体 ROS 的动态平衡,防止细胞及组织等受到氧化胁迫<sup>[10]</sup>。

植物的抗氧化系统作为植物抵抗逆境胁迫的一种重要机制,包括抗氧化酶和非酶抗氧化剂<sup>[11-12]</sup>。酶类抗氧化系统包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)等,非酶抗氧化剂包括抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、类黄酮(flavonoids, FLA)、原花青素(oligomeric proanthocyanidins, OPC)等<sup>[13]</sup>。在植物修复重金属污染中,增强植物的抗氧化系统能有效提高植物的抗性,缓解植物在重金属胁迫环境中受到的毒害反应。因此,植物抗氧化系统应激重金属胁迫的研究对进行土壤重金属的修复和保障生态环境安全具有重要的意义。

豆科植物-根瘤菌共生体系是已知的固氮体系强、抗逆性高的共生体系之一<sup>[14]</sup>,因而被广泛应用于重金属污染土壤修复中。Ma 等<sup>[15]</sup>将耐镍的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) A3R3 接种于香雪球和芥菜,显著促进了植物生长,从而提高了植物对污染土壤中镍的去除率并实现了一定的修复效果。Abd-Alla 等<sup>[16]</sup>发现将类黄酮化合物激活的根瘤菌接种到镍胁迫下的胡芦巴根上,能对其根瘤形成、固氮、生长产生促进作用。

豆科乔木水黄皮种子油脂组成比例好,是最佳生物燃油原材料,具有抗风、耐盐碱、抗旱和耐涝等抗逆性和独特的生态功能<sup>[17]</sup>,是矿区生态修复的理想植物。Yu 等<sup>[18]</sup>构建水黄皮-根瘤菌联合修复体系以修复改善攀西钒钛磁铁矿

生态环境,揭示了豆科植物修复可以有效地使重金属污染土壤中的微生物群落向根瘤菌转移,使土壤固氮能力增强,有效氮、磷含量和酶活性均提高,使矿区土壤健康状况显著改善。水黄皮高油籽产量的潜力使其在修复矿区生态环境的同时,还能实现废弃矿区的复垦,产生经济效益,缓解能源危机<sup>[19]</sup>,因此提升水黄皮在重金属污染土壤中的抗逆性是水黄皮持续修复矿区生态的关键。目前已有报道根瘤菌共生固氮能够提高豆科植物的抗逆性,但根瘤菌与豆科植物共生固氮具有寄主专一性,不同根瘤菌株对水黄皮的影响各不相同。因此,本实验在不同浓度  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫下的水黄皮上接种耐镍的快生根瘤菌(*Rhizobium* sp.) PP3,研究水黄皮幼苗根、茎、叶对镍胁迫的抗氧化酶和非酶抗氧化剂的响应,以期阐明快生根瘤菌 PP3 对镍胁迫下水黄皮的抗氧化应激规律,为利用快生根瘤菌 PP3-水黄皮联合修复镍污染土壤过程中提高水黄皮抗逆性提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

快生根瘤菌(*Rhizobium* sp.) PP3 捕获分离自攀西钒钛磁铁尾矿土壤<sup>[20]</sup>,其对镍存在抗性,用 30%甘油保存于-80 °C 冰箱中。水黄皮种子采自海南省文昌市东阁镇红树林。

### 1.2 培养基

酵母甘露醇液体培养基(g/L):甘露醇 10.0,酵母粉 1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, NaCl 0.1,  $\text{CaCO}_3$  3.0, pH 7.0-7.2, 121-126 °C 湿热灭菌 30 min。

### 1.3 主要试剂和仪器

ELISA 试剂盒,上海科兴商贸有限公司。立式高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;双层恒温摇床,武汉汇诚生物技术有限公司;

紫外分光光度计和可见光分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 台式离心机, 艾本德中国有限公司; Leonard Jar 培养装置, 郑州朋检农业科技有限公司。

#### 1.4 根瘤菌回接盆栽实验

根据预实验发现水黄皮对 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫存在应激反应, 结合根瘤菌 PP3 对 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  也存在抗性, 因此以含有 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  和不含  $\text{Ni}^{2+}$  的蛭石作为水黄皮盆栽基质开展根瘤菌的回接实验。蛭石盆栽实验采用 Leonard Jar<sup>[21]</sup> 培养装置: 将筛选好的水黄皮种子先进行表面灭菌, 于无菌培养皿中育种, 待其长出胚芽, 植入已灭菌的上部分装有 2/3 蛭石的 Leonard Jar 培养装置中, 去掉顶部封口膜。实验设计 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫处理, 并以不含  $\text{Ni}^{2+}$  的蛭石作为对照 (表 1)。待种子幼苗长至 3 cm 左右时, 接种水黄皮共生根瘤菌 PP3, 将根瘤菌以浓度为  $10^8$ – $10^9$  CFU/株菌悬液浇灌到水黄皮幼苗根系周围基质中, 并以不接根瘤菌作为对照。接种根瘤菌后在蛭石表面覆盖无菌石英砂。温室培

养条件为白天 16 h (25 °C), 夜晚 8 h (17 °C), 湿度为 90%。每个处理设置 3 个重复, 种植过程中补充灭菌的营养液。在光照培养室中培养 55 d 后, 取水黄皮根、茎、叶鲜样测定其根长、株高和生物量。

#### 1.5 水黄皮抗氧化酶活性和非酶抗氧化剂含量测定

利用酶联免疫法<sup>[22]</sup>测定不同处理中水黄皮根、茎、叶中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的活性, 以及谷胱甘肽(GSH)、类黄酮(FLA)、抗坏血酸(AsA)、原花青素(OPC)这 4 种非酶抗氧化剂的含量。

#### 1.6 数据处理

采用 Microsoft Office 2021 进行数据处理、统计分析和作图, 采用 SPSS 25.0 中 Waller-Duncan test 在  $P<0.05$  水平下表现不同处理间的显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮根长、株高和生物量的影响

如表 2 所示, 在无  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫的盆栽中, 施氮条件下接种根瘤菌 PP3 相较于不接菌(CK)使水黄皮根长和株高分别显著增加 69.0%、37.3%; 不施氮条件下接种根瘤菌 PP3 相较于 CK 使水黄皮根长和株高分别显著增加 199.2%、19.1%。在 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫盆栽中, 施用氮或不施氮条件下接种根瘤菌对水黄皮的株高、根长和生物量均无显著影响。不接种根瘤菌 PP3 的情况下, 根长在 40 mg/L 的镍胁迫且不施氮的条件下显著高于其他处理; 接种根瘤菌 PP3 后, 根长在无镍胁迫且不施氮的条件下显著高于其他处理, 株高在不施氮且镍浓度为 40 mg/L 的条件下显著低于其他处理,

表 1 水黄皮盆栽实验处理

Table 1 Pot experiment treatment of *Pongamia pinnata*

Treatment	Inoculation of rhizobia	Nitrogen treatment	$\text{Ni}^{2+}$ (mg/L)
T1	Without rhizobia CK	With nitrogen $\text{N}^+$	0
T2	Without rhizobia CK	With nitrogen $\text{N}^+$	40
T3	Without rhizobia CK	Without nitrogen $\text{N}^-$	0
T4	Without rhizobia CK	Without nitrogen $\text{N}^-$	40
T5	With rhizobia PP3	With nitrogen $\text{N}^+$	0
T6	With rhizobia PP3	With nitrogen $\text{N}^+$	40
T7	With rhizobia PP3	Without nitrogen $\text{N}^-$	0
T8	With rhizobia PP3	Without nitrogen $\text{N}^-$	40

表 2 不同处理条件下水黄皮的根长、株高和生物量

Table 2 Root length, Plant height, biomass of *Pongamia pinnata* in different treatment conditions

Growth indicators	Treatment	Ni0 (N <sup>+</sup> )	Ni40 (N <sup>+</sup> )	Ni0 (N <sup>-</sup> )	Ni40 (N <sup>-</sup> )
Root length (cm)	PP3	49.0±6.6aC	41.3±5.7aC	116.7±4.5aA	77.0±7.9aB
	CK	29.0±5.6bC	32.0±2.6aBC	39.0±3.6bB	75.3±5.0aA
Plant height (cm)	PP3	65.9±7.7aA	64.0±4.6aA	58.7±3.1aA	46.7±6.1aB
	CK	48.0±6.6bA	58.7±6.0aA	49.3±4.0bA	55.3±5.1aA
Biomass (g/plant)	PP3	8.1±1.2aB	12.7±2.7aA	10.2±1.3aAB	7.0±2.0aB
	CK	8.7±3.4aA	9.2±3.3aA	9.8±1.2aA	8.9±1.6aA

不同小写字母表示相同处理下接种和未接种 PP3 之间水黄皮生长指标差异显著; 不同大写字母表示接种和未接种 PP3 的水黄皮在不同处理之间的生长指标差异显著

Different lowercase letters indicate significant difference in the growth indicators of *Pongamia pinnata* between inoculated and non inoculated PP3 under the same treatment. Different capital letters indicate significant difference in the growth indicators of *P. pinnata* between inoculated and non inoculated PP3 under the different treatments.

而生物量在 Ni<sup>2+</sup>浓度为 40 mg/L 且施氮的条件下最大。

## 2.2 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮中抗氧化酶活性的影响

### 2.2.1 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮根中 4 种抗氧化酶活性的影响

如图 1 所示, 在水黄皮根中, 4 种抗氧化酶活性强弱为 SOD>POD>CAT>GR, 其中 GR 的活性非常低。根瘤菌 PP3、镍(Ni)、氮(N)处理对 4 种抗氧化酶活性有不同程度的影响。在不接菌条件下施氮(N<sup>+</sup>)处理中, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度从 0 mg/L 增加到 40 mg/L, CAT 活性显著增加 104.1%, POD 活性显著降低 16.8%; 不施氮(N<sup>-</sup>)处理的 SOD、POD 活性显著高于施氮(N<sup>+</sup>)处理的活性, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度从 0 mg/L 增加到 40 mg/L, CAT 活性显著降低 17.0%, SOD 活性显著提高 31.2%, GR 活性显著提高 39.6%。

与接种根瘤菌 PP3 相比, 4 个处理中的 POD 活性均较 CK 有所降低; 在施氮(N<sup>+</sup>)处理根中的 CAT 活性显著高于不施氮(N<sup>-</sup>)处理。在 0 mg/L Ni<sup>2+</sup>时, 根中的 CAT 活性较 CK 显著升高 104.8%; 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加到 40 mg/L, SOD 活性显著增加 23.9%, 较 CK 显著升高 80.9%,

GR 活性显著提高 61.6%, 较 CK 显著升高 67.9%。在不施氮(N<sup>-</sup>)处理中, CAT 活性较 CK 均降低, 说明接种根瘤菌 PP3 抑制了根中的 CAT 活性, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度的增加, 根中的 GR 活性显著降低, 且较 CK 显著降低 41.5%。在 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>和不施氮(N<sup>-</sup>)的双重胁迫下, 根中的 SOD 活性较 CK 显著降低 36.3%。即接种根瘤菌 PP3, 在施氮(N<sup>+</sup>)处理下能显著提高水黄皮根中 SOD 的活性, 而在不施氮(N<sup>-</sup>)处理下根中 SOD 的活性无显著变化或受到抑制, 在施氮(N<sup>+</sup>)和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>处理下, 接种根瘤菌 PP3 能显著提高根中的 GR 活性, 抑制根中 POD 的活性。

### 2.2.2 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮茎中 4 种抗氧化酶活性的影响

由图 2 看出, 在水黄皮茎中, 4 种抗氧化酶活性强弱为 SOD>POD>CAT>GR, 镍(Ni)、氮(N)处理对 4 种抗氧化酶活性有不同程度的影响。在不接种根瘤菌的对照中, 不施氮(N<sup>-</sup>)处理的水黄皮茎中的 GR、CAT 活性显著高于施氮(N<sup>+</sup>)处理; 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加到 40 mg/L, SOD 活性显著提高 48.1%, 而 GR、CAT 与 POD 活性均无显著差异, 而 POD 活性在施氮(N<sup>+</sup>)处理中显著降低 17.4%, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加到 40 mg/L, CAT 活

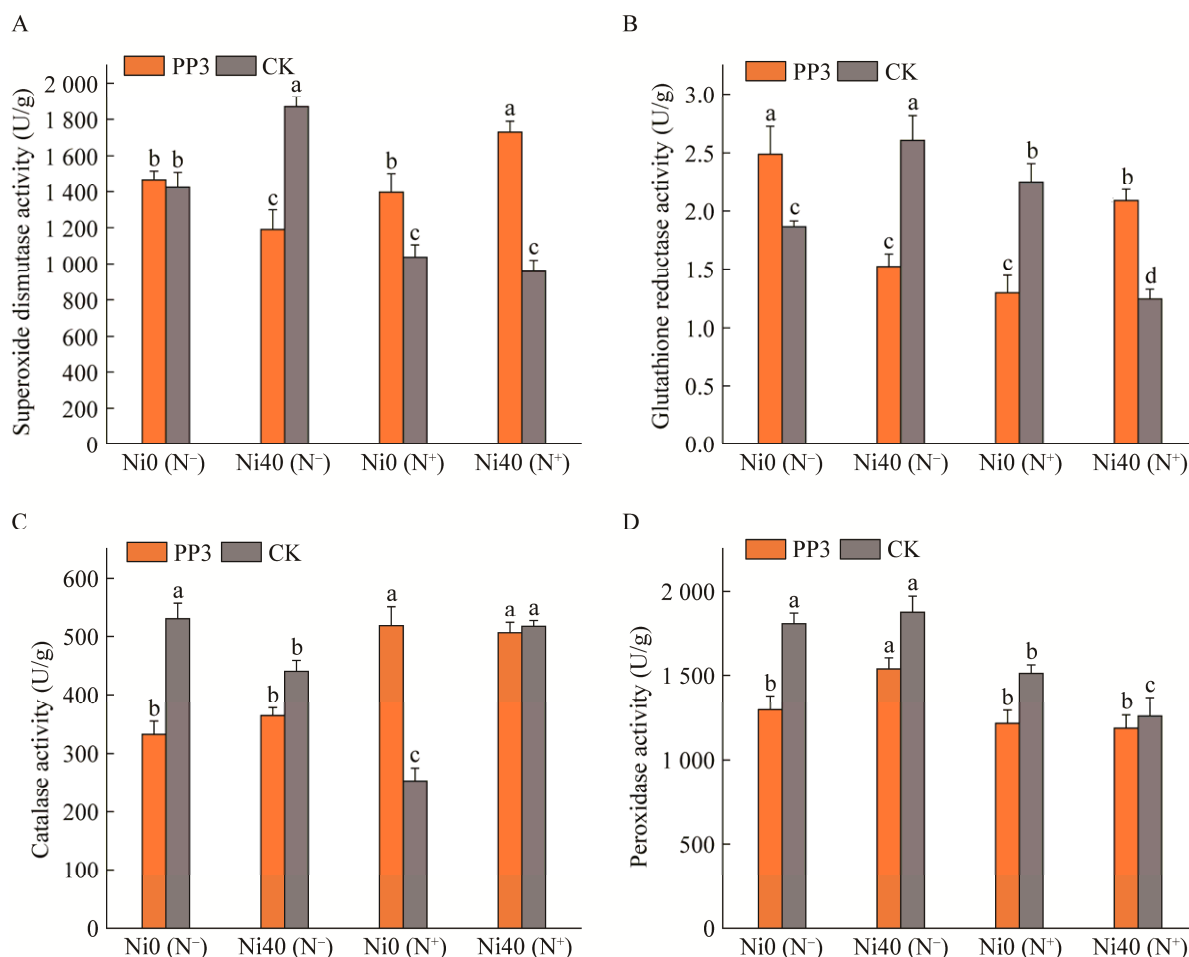


图 1 根瘤菌对镍胁迫水黄皮根中抗氧化酶活性的影响 A: 超氧化物歧化酶. B: 谷胱甘肽还原酶. C: 过氧化氢酶. D: 过氧化物酶. 不同小写字母表示差异显著

Figure 1 Effect of rhizobia on antioxidant enzyme activity in nickel-stressed *Pongamia pinnata* roots. A: Superoxide dismutase (SOD). B: Glutathione reductase (GR). C: Catalase (CAT). D: Peroxidase (POD). Different lowercase letters indicate significant differences.

性显著降低 15.6%, 而 POD 活性显著增加 127.8%, 增强了茎中的抗氧化防御。

接种根瘤菌 PP3, GR 活性均不高, 且 4 个处理无显著差异; 4 个处理中的 CAT 活性较 CK 均有所降低。在施氮(N<sup>+</sup>)条件下, 0 mg/L 和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>两组处理中 GR 活性分别较 CK 显著升高 21.5%和 12.1%, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度从 0 mg/L 增加到 40 mg/L, SOD 活性显著升高 24.2%, 且较 CK 显著升高 21.2%, 在 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>时, POD

活性较 CK 显著降低 54.8%; 在不施氮(N<sup>-</sup>)处理下, GR 活性则较 CK 分别降低 26.5%和 21.5%, 其活性受到抑制, 而 POD 活性显著高于施氮(N<sup>+</sup>)处理, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加到 40 mg/L, POD 活性增加 19.0%, 且在 0 mg/L 和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>时较 CK 显著升高 41.8%和 61.8%。但在 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>和不施氮(N<sup>-</sup>)的双重胁迫下, SOD 活性较 CK 降低 18.3%。即在不施氮(N<sup>-</sup>)胁迫下, 水黄皮通过升高茎中的 GR 活性来适应不良环境。

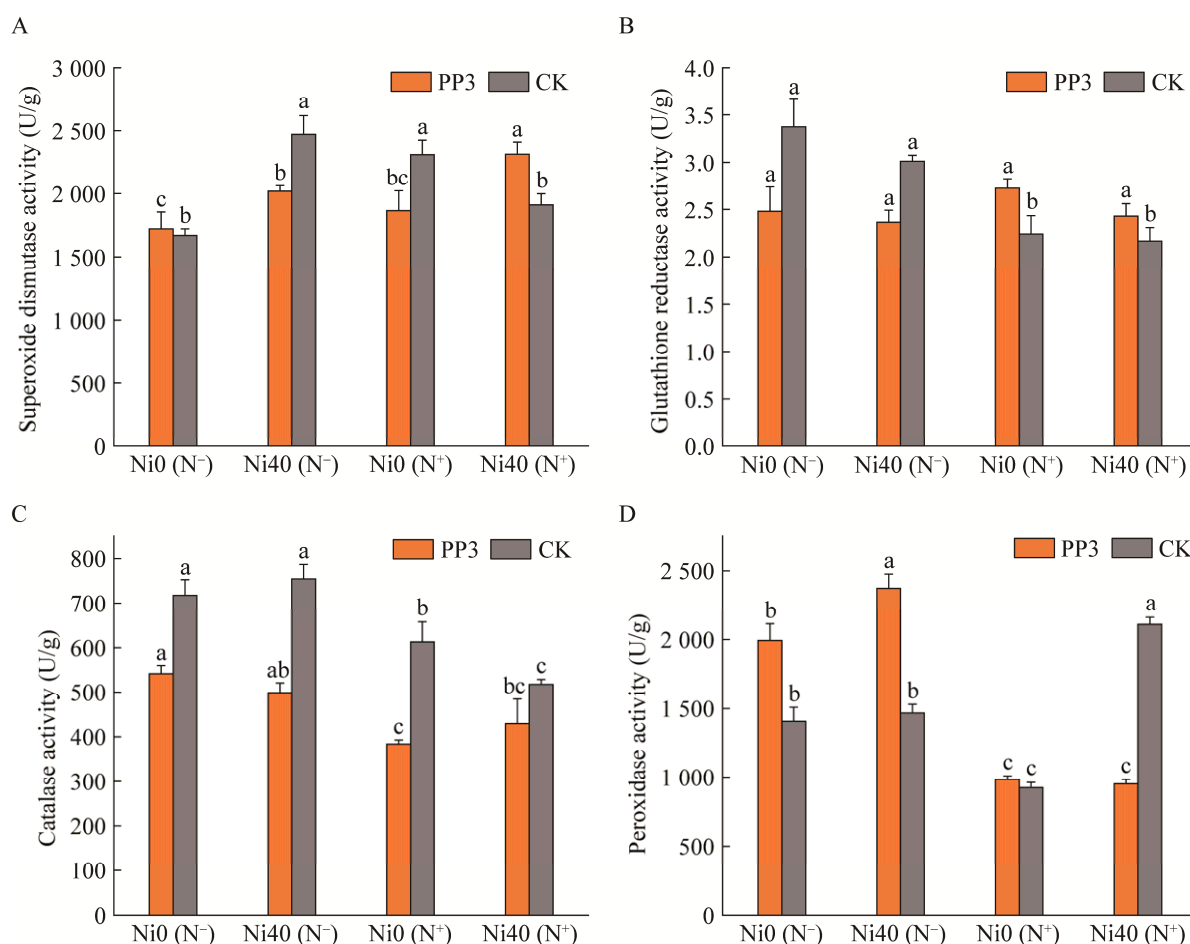


图2 根瘤菌对镍胁迫水黄皮茎中抗氧化酶活性的影响 A: 超氧化物歧化酶. B: 谷胱甘肽还原酶. C: 过氧化氢酶. D: 过氧化物酶. 不同小写字母表示差异显著

Figure 2 Effect of rhizobia on antioxidant enzyme activity in nickel-stressed *Pongamia pinnata* stems. A: Superoxide dismutase. B: Glutathione reductase. C: Catalase. D: Peroxidase. Different lowercase letters indicate significant differences.

### 2.2.3 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮叶中4种抗氧化酶活性的影响

如图3所示,在水黄皮叶中,4种抗氧化酶活性强弱为 SOD>POD>CAT>GR, 其中 GR 的活性非常低,镍(Ni)、氮(N)处理对4种抗氧化酶活性有不同程度的影响。在不接菌处理下,叶中的 SOD 与 GR 活性在4个处理组间无显著差异,且叶中 GR 活性明显高于根、茎中 GR 活性,施氮(N<sup>+</sup>)处理下, CAT 与 POD 活性在两组间无显著差异;在不施氮(N<sup>-</sup>)中随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加到

40 mg/L, 叶中的 CAT 活性显著降低 41.2%, POD 活性显著增加 55.3%。

接种菌株 PP3, 在施氮(N<sup>+</sup>)处理下, SOD、CAT 的活性较 CK 均降低, GR 活性在 0 mg/L 和 40 mg/L Ni<sup>2+</sup>较 CK 显著降低 26.2%和 29.4%, POD 活性较 CK 分别显著升高 49.2%和 47.9%;在不施氮(N<sup>-</sup>)处理下, GR 活性显著高于施氮(N<sup>+</sup>)处理, POD 两组间并无太大差异,当 0 mg/L Ni<sup>2+</sup>时 SOD 活性较高,为 2 722 U/g, 显著高于组间处理和组内 CK, GR 较 CK 显著升高 21.4%,

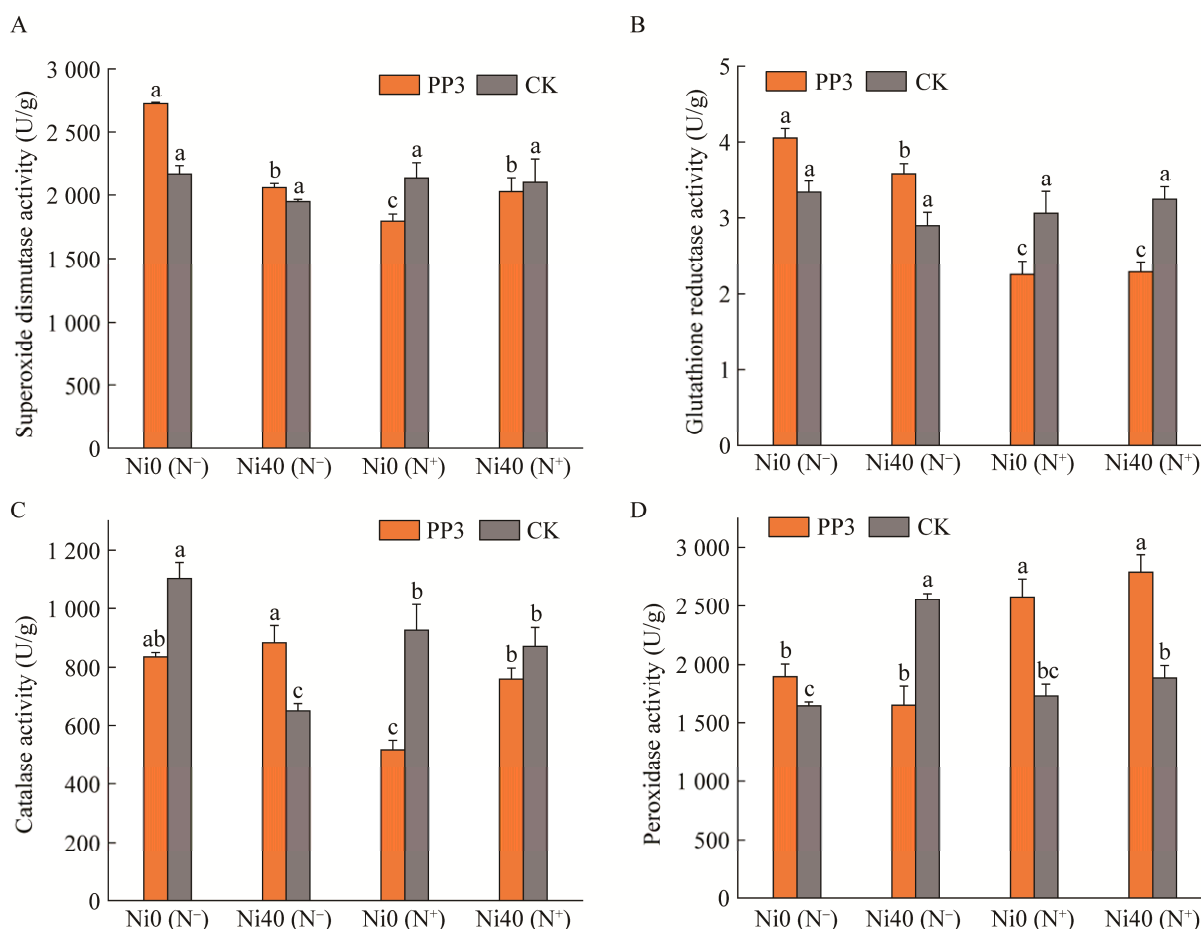


图 3 根瘤菌对镍胁迫水黄皮叶中抗氧化酶活性的影响 A: 超氧化物歧化酶. B: 谷胱甘肽还原酶. C: 过氧化氢酶. D: 过氧化物酶. 不同小写字母表示差异显著

Figure 3 Effect of rhizobia on antioxidant enzyme activity in nickel-stressed *Pongamia pinnata* leaves. A: Superoxide dismutase. B: Glutathione reductase. C: Catalase. D: Peroxidase. Different lowercase letters indicate significant differences.

随着  $\text{Ni}^{2+}$  浓度升高到 40 mg/L, SOD 活性有所降低, 但略高于 CK, CAT 活性增加 5.7%, 而 CAT 与 GR 分别较 CK 显著升高 36.0% 与 23.6%, POD 活性较 CK 显著降低 35.4%, 即接种 PP3 可以显著提高叶中的 GR 与 CAT 活性。

## 2.3 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮非酶抗氧化剂含量的影响

### 2.3.1 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮根中 4 种非酶抗氧化剂含量的影响

如图 4 所示, 在水黄皮根中, 4 种非酶抗

氧化剂含量高低为  $\text{GSH} > \text{FLA} > \text{OPC} > \text{AsA}$ , 其中 AsA 含量非常低, 镍(Ni)、氮(N)处理对 4 种非酶抗氧化剂含量有不同程度的影响。CK 处理中, 不施氮( $\text{N}^-$ )条件下, 当  $\text{Ni}^{2+}$  浓度由 0 mg/L 增加到 40 mg/L 时, OPC 含量显著降低 29.0%, GSH 含量显著上升 55.0%; 而施氮条件( $\text{N}^+$ )下, AsA 含量显著上升, OPC 含量在 0 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  和 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  条件下相比于施氮处理分别下降 18.3% 和 11.1%。接种菌株 PP3, 不施氮( $\text{N}^-$ )条件下, OPC 与 GSH 含量均随 Ni 浓度上升而下降,



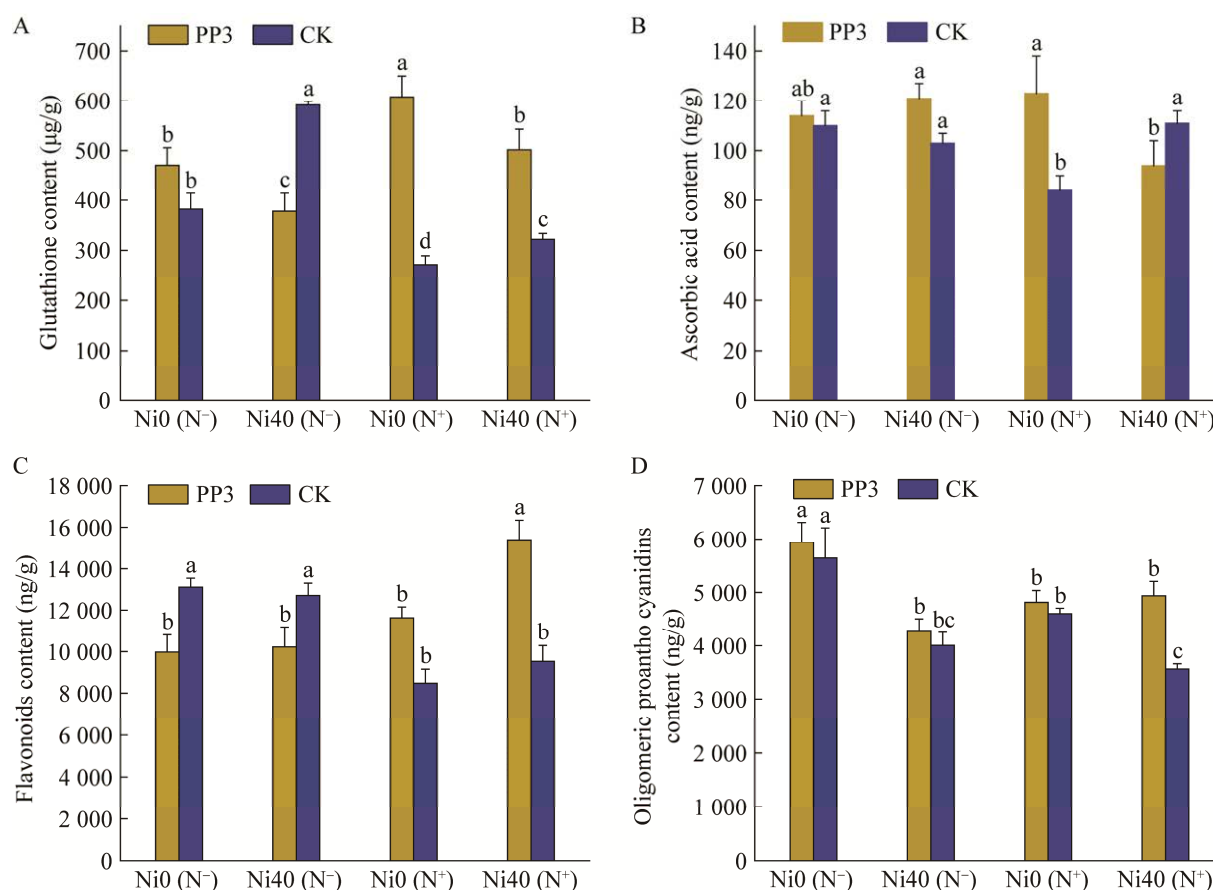


图4 根瘤菌对镍胁迫水黄皮根中非酶抗氧化剂含量的影响 A: 谷胱甘肽. B: 抗坏血酸. C: 类黄酮. D: 原花青素. 不同小写字母表示差异显著

Figure 4 Effect of rhizobia on the content of non-enzymatic antioxidants in nickel-stressed *Pongamia pinnata* roots. A: Glutathione (GSH). B: Ascorbic acid (AsA). C: Flavonoids (FLA). D: Oligomeric proanthocyanidins (OPC). Different lowercase letters indicate significant differences.

但 OPC 含量均高于对照组,说明 PP3 有助于提升 OPC 含量以应激重金属 Ni 胁迫;施入氮素条件下,当  $\text{Ni}^{2+}$  浓度由 0 mg/L 增加到 40 mg/L 时, GSH 含量大幅下降,但仍高于不施氮( $\text{N}^-$ )处理与 CK 处理下 GSH 的含量,而 FLA 含量显著升高,高于同条件下 CK 组与不施氮( $\text{N}^-$ )组。即氮素施入与接种 PP3 有利于水黄皮根中非酶抗氧化剂含量的增加。

### 2.3.2 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮茎中 4 种非酶抗氧化剂含量的影响

从图 5 看出,在水黄皮茎中,4 种非酶抗

氧化剂含量高低为  $\text{GSH} > \text{FLA} > \text{OPC} > \text{AsA}$ ,其中 AsA 的含量非常低,镍(Ni)、氮(N)处理对 4 种非酶抗氧化剂含量有不同程度的影响。CK 处理中不施氮( $\text{N}^-$ )条件下,随  $\text{Ni}^{2+}$  含量由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, FLA 含量显著上升 21.3%, OPC 含量下降 29.0%;施氮( $\text{N}^+$ )条件下,随  $\text{Ni}^{2+}$  含量由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, OPC、AsA 和 FLA 含量均上升,分别上升 16.9%、20.2%和 19.2%,而 GSH 大幅下降至 651 μg/g。不施氮( $\text{N}^-$ )条件下,接种 PP3,随  $\text{Ni}^{2+}$  含量由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, GSH 与 FLA 显著下降,分别下降 38.9%、37.2%,

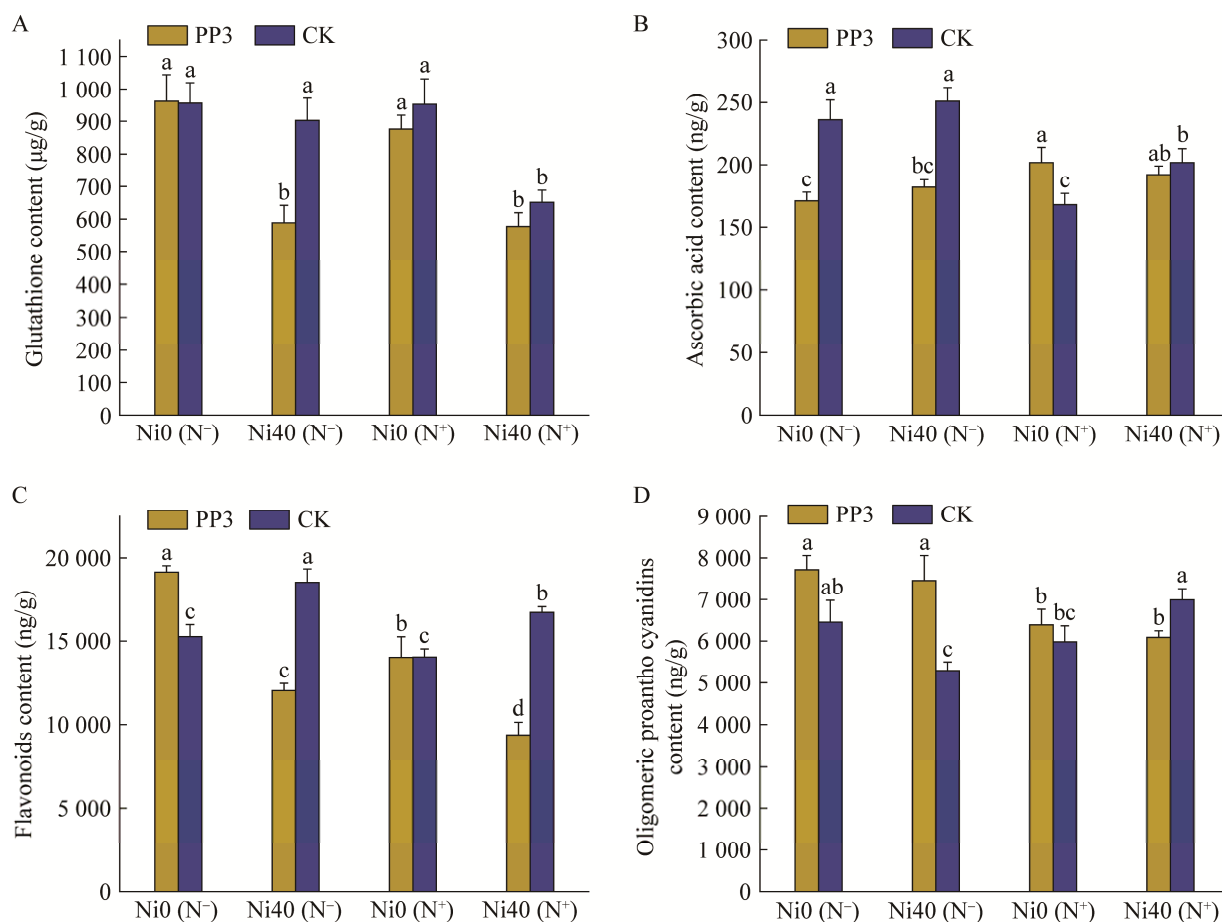


图 5 根瘤菌对镍胁迫水黄皮茎中非酶抗氧化剂含量的影响 A: 谷胱甘肽. B: 抗坏血酸. C: 类黄酮. D: 原花青素. 不同小写字母表示差异显著

Figure 5 Effect of rhizobia on the content of non-enzymatic antioxidants in nickel-stressed *Pongamia pinnata* stems. A: Glutathione. B: Ascorbic acid. C: Flavonoids. D: Oligomeric proantho cyanidins. Different lowercase letters indicate significant differences.

而 OPC 含量无明显变化, 均高于对照组, OPC 与 FLA 含量均高于施氮组; 而施氮(N<sup>+</sup>)条件下, 随 Ni<sup>2+</sup> 含量由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, GSH 与 FLA 含量均显著下降。施氮对于非酶抗氧化剂的产生有抑制作用, 而接入 PP3 有助于缓解抑制现象。

### 2.3.3 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮叶中 4 种非酶抗氧化剂含量的影响

如图 6 所示, 在水黄皮叶中, 4 种非酶抗氧化剂含量高低为 GSH>FLA>OPC>AsA, 其中

AsA 的含量非常低, 镍(Ni)、氮(N)处理对 4 种非酶抗氧化剂含量有不同程度的影响。CK 处理下, 不施氮(N<sup>-</sup>)处理中, 随重金属 Ni<sup>2+</sup> 浓度由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, OPC、FLA 含量分别下降 16.4%、15.6%, 而 GSH 含量上升 19.6%; 施氮(N<sup>+</sup>)条件下, 随重金属 Ni<sup>2+</sup> 浓度由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, OPC、AsA 含量分别上升 22.8%、18.4%, 其中 OPC 含量与无重金属胁迫、不施氮(N<sup>-</sup>)组无显著差异, 40 mg/L Ni<sup>2+</sup> 胁迫下的 AsA 含量高于其余各处理, FLA、GSH 含量同比于不施氮(N<sup>-</sup>)

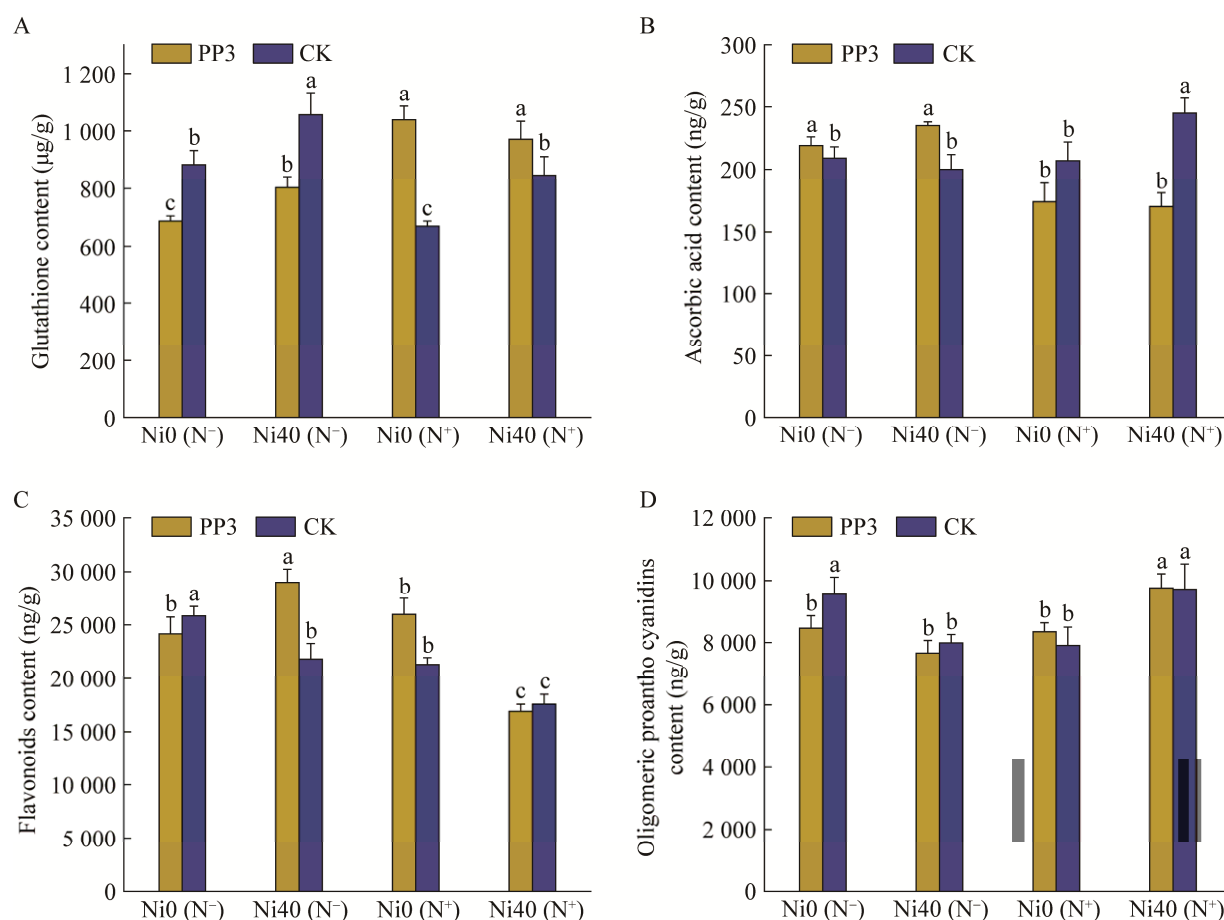


图6 根瘤菌对镍胁迫水黄皮叶中非酶抗氧化剂含量的影响 A: 谷胱甘肽. B: 抗坏血酸. C: 类黄酮. D: 原花青素. 不同小写字母表示差异显著

Figure 6 Effect of rhizobia on the content of non-enzymatic antioxidants in nickel-stressed *Pongamia pinnata* leaves. A: Glutathione. B: Ascorbic acid. C: Flavonoids. D: Oligomeric proantho cyanidins. Different lowercase letters indicate significant differences.

组均下降。接入 PP3 菌种, 不施氮(N<sup>-</sup>)条件下, 随重金属 Ni<sup>2+</sup>浓度由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, GSH、FLA 含量分别上升 17.1%、20.1%; 施氮(N<sup>+</sup>)条件下, GSH 含量同比与未施氮(N<sup>-</sup>)两组分别上升 20.9%、51.5%, 而 AsA、FLA 均低于不施氮(N<sup>-</sup>)组; 随重金属 Ni<sup>2+</sup>浓度由 0 mg/L 增加至 40 mg/L, OPC 含量上升 16.9%。因此, 对于 GSH、FLA 来说, 施氮(N<sup>+</sup>)不利于水黄皮非酶抗氧化剂的产生, 而 PP3 可较为有效地帮助缓解氮素产生的不利影响, 接种根瘤菌 PP3 有利

于水黄皮非酶抗氧化剂的产生。

### 3 讨论

#### 3.1 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮根长、株高和生物量的影响

植物在重金属污染的土壤中生长会吸收其中的重金属, 如果重金属在植物体内积累过多, 则会影响植物的生长发育<sup>[23]</sup>。在不接种根瘤菌条件下, 随着 Ni<sup>2+</sup>浓度从 0 mg/L 增加到 40 mg/L, 水黄皮根长在施氮素和不施氮素的胁迫下分别

增加 10.3%和 93.1%,说明水黄皮为抵御重金属镍胁迫,不断增加根的长度,以便在更深层重金属含量少的土壤中获取养分。在接种根瘤菌 PP3 后,各处理下的水黄皮根长均较 CK 有大幅度的增长,说明根瘤菌 PP3 有利于水黄皮根的伸长。在  $\text{Ni}^{2+}$  浓度 40 mg/L 且施氮条件下,接种根瘤菌 PP3 的株高和生物量分别提升 9.0% 和 38.0%,说明根瘤菌也在一定程度上促进了水黄皮的生长发育。在 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫盆栽中,施用氮或不施氮条件下接种根瘤菌对水黄皮的株高、根长和生物量无显著影响,说明 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  是水黄皮生长的主效因子。

### 3.2 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮抗氧化酶活性的影响

在镍胁迫下,植物会产生更多的活性氧,使植物组织受到损坏,这表明镍能够对植物造成一定的氧化损伤<sup>[24]</sup>。植物抗氧化酶是植物抵抗重金属胁迫的重要指标,重金属刺激植物产生应激反应,产生较多的抗氧化酶来清除体内过多的氧自由基,因此其活性增加表明植物抗逆性增强<sup>[25]</sup>。水黄皮在不施用氮素时,随着  $\text{Ni}^{2+}$  浓度从 0 mg/L 增加到 40 mg/L,根中的 SOD、GR 和 POD 活性分别升高 31.3%、39.6 和 4.0%,起着主要的抗氧化防御作用;茎中的 SOD 活性显著升高 44.8%;叶中的 POD 活性显著升高 55.3%,SOD 和 GR 活性较高但无显著变化,CAT 活性降低 41.2%。可以认为在镍胁迫下,水黄皮的抗氧化酶系统在抵御这种不良影响的耐性机制中发挥了一定作用,其中抗氧化酶 SOD、POD、GR 发挥了主要作用。

利用豆科植物与根瘤菌之间的固氮共生体系,能有效增加污染土壤氮素的累积,促进植物生长,增强植物耐受力<sup>[26]</sup>,重金属抗性的根瘤菌还可产生促植物生长因子,改变金属的生物利用率,或增强植物的抗氧化酶活性,这些

都有利于植物对重金属的吸收和对重金属的耐受性<sup>[27]</sup>。当植物遭受胁迫时,植物促生菌具有促进抗氧化酶系统响应的作用<sup>[28]</sup>。Husna 等<sup>[29]</sup>发现其所筛选的内生真菌菌株通过提高过氧化物酶、抗坏血酸氧化酶、自由基清除酶和过氧化氢酶的产量来促进大豆幼苗的抗氧化系统。镍胁迫下的水黄皮接种镍耐受性较强的根瘤菌 PP3 可使水黄皮在一定程度上强化防御机制,提高抗氧化酶活。共生根瘤菌可通过增加水黄皮组织中抗氧化酶活性来提高水黄皮植株对镍的抗逆性,但不同属的根瘤菌株对水黄皮抗氧化酶活性的影响不同。本研究通过接种根瘤菌属(*Rhizobium*)中根瘤菌株 PP3 对水黄皮应激镍胁迫表现出的不同影响作用,说明根瘤菌株 PP3 对水黄皮不同组织中抗氧化酶和抗氧化剂的影响不同。在不施氮和 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫下,水黄皮根中的 4 种抗氧化酶活性均有所降低,但叶中的 SOD、GR 和 CAT 活性分别增加 5.7%、23.6%和 36.0%,茎中的 POD 活性增加 61.8%,说明镍胁迫下水黄皮抗氧化防御系统增强起着主要抗氧化防御作用。

在不施氮处理下,接种菌株 PP3 水黄皮叶中的 GR 活性和茎中的 POD 活性均高于对照,但茎中 CAT 活性均低于对照,水黄皮幼苗的抗氧化酶活受到抑制。在不同氮素水平下,不同的镍浓度胁迫处理,水黄皮的不同组织在抗氧化防御机制中发挥主要作用的抗氧化酶种类与活性不同,因此,重金属胁迫下接种根瘤菌对共生豆科植物抗氧化酶活性的促进或抑制作用是由植物组织、重金属胁迫的浓度、营养胁迫和共生根瘤菌等多种影响因子共同决定的。

### 3.3 镍胁迫下根瘤菌对水黄皮非酶抗氧化剂含量的影响

植物体不仅通过抗氧化酶系统来消除活性氧等的危害,非酶物质在消除重金属毒害中也

发挥重要作用<sup>[30]</sup>。在镍胁迫下,植物体内会产生大量活性氧自由基,ROS 是否会起到破坏性或信号分子的作用,取决于 ROS 产生和清除之间的微妙平衡<sup>[31]</sup>。然而,细胞内高浓度的 ROS 将会使膜脂、蛋白质和核酸等生物分子过氧化而造成细胞伤害<sup>[32]</sup>,非酶物质在保护植物镍胁迫的负面影响方面发挥着主要作用。

共生根瘤菌可通过增加水黄皮组织中非酶抗氧化剂的含量来提高水黄皮植株对镍的抗逆性,但不同属的根瘤菌对水黄皮非酶抗氧化剂含量的影响不同<sup>[33]</sup>。本研究中接种根瘤菌株 PP3 对水黄皮不同组织中抗氧化酶和抗氧化剂的影响不同,也说明同一菌株在不同重金属浓度和不同施氮条件下对水黄皮抗氧化防御系统的影响不同。在不施用氮素的条件下接种根瘤菌 PP3,  $\text{Ni}^{2+}$  浓度在 0 mg/L 和 40 mg/L 时水黄皮根中的 OPC 和 AsA 含量都高于不接种根瘤菌处理,分别高出 5.3%、6.6%和 3.6%、17.5%,茎中的 OPC 含量在 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  下显著高出对照 41.0%,起主要的防御作用;而其余非酶抗氧化剂 GSH、FLA 则呈现出不同程度的下降。在 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  不施用氮素的条件下,接种根瘤菌 PP3 使水黄皮叶中 AsA 和 FLA 含量分别提升 17.5%、33.1%。在不同氮素水平、不同镍离子浓度胁迫、不同根瘤菌株和不同植物组织中非酶抗氧化剂含量呈现出不同变化,因此需要综合考虑各影响因素对于水黄皮抗氧化系统应激镍胁迫的反应才能得出更加准确的结论。

## 4 结论

根瘤菌在镍胁迫条件下对水黄皮植株的抗氧化酶活性和非酶抗氧化剂含量均产生了积极的调节作用,在一定程度上有利于水黄皮生物量的增长,增加水黄皮的根长和株高。水黄皮植株中的抗氧化酶活性强弱为  $\text{SOD} > \text{POD} > \text{CAT} > \text{GR}$ ,

非酶抗氧化剂含量高低为  $\text{GSH} > \text{FLA} > \text{OPC} > \text{AsA}$ 。在不施氮和 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫处理下,接种根瘤菌 PP3 使水黄皮茎中的 POD 活性增加 61.8%,叶中的 SOD、GR 和 CAT 活性分别增加 5.7%、23.6%和 36.0%;在施氮和 40 mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  胁迫处理下,接种根瘤菌 PP3 使水黄皮根中 GSH、FLA 和 OPC 含量升高 55.9%、61.6%和 38.6%,水黄皮植株叶中 GSH 含量升高 14.8%。说明共生根瘤菌通过改变植物的抗氧化酶活性和非酶抗氧化剂含量来缓解镍对水黄皮的胁迫,明晰了共生根瘤菌介导水黄皮抗氧化防御系统对镍胁迫的应激规律并为强化镍等重金属污染土壤中水黄皮的抗逆性提供了理论依据。然而,本研究还存在一些局限性,如仅研究了镍胁迫条件下的抗氧化酶活性和非酶抗氧化剂含量变化,未深入探讨根瘤菌与水黄皮植株之间的分子机制或在其他重金属胁迫下水黄皮抗氧化防御系统的响应。因此,可进一步探讨镍等逆境因子胁迫下根瘤菌与水黄皮的互作应答机制,从而为根瘤菌与水黄皮联合修复镍等重金属污染提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] 全国土壤污染状况调查公报(2014-04-17)[R]. 2014(6): 8-10. [https://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content\\_2661768.htm](https://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content_2661768.htm).  
Report on the national general survey of soil contamination (2014-04-17)[R]. 2014(6): 8-10. [https://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content\\_2661768.htm](https://www.gov.cn/foot/2014-04/17/content_2661768.htm) (in Chinese).
- [2] SHAHZAD B, TANVEER M, REHMAN A, CHEEMA SA, FAHAD S, REHMAN S, SHARMA A. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment-a review[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 132: 641-651.
- [3] WANG Q, XIONG D, ZHAO P, YU X, TU B, WANG G. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(5): 1065-1074.

- [4] ABDELGAWAD H, ZINTA G, HAMED BA, SELIM S, BEEMSTER G, HOZZEIN WN, WADAAN M, ASARD H, ABUELSOUD W. Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113705.
- [5] 蒋喜艳, 张述习, 尹西翔, 张少鹏, 李汀, 王利红. 土壤-作物系统重金属污染及防治研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(6): 150-160.
- JIANG XY, ZHANG SX, YIN XX, ZHANG SP, LI T, WANG LH. Research progress on heavy metals pollution and its control in soil-crop system[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(6): 150-160 (in Chinese).
- [6] GALL JE, BOYD RS, RAJAKARUNA N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2015, 187(4): 201.
- [7] CAO HM, YANG YZ, HUANG BY, ZHANG YZ, WU Y, WAN Z, MA L. A cross-sectional study of the association between heavy metals and pan-cancers associated with sex hormones in NHANES 1999–2018[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(21): 61005-61017.
- [8] MØLLER IM, JENSEN PE, HANSSON A. Oxidative modifications to cellular components in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58: 459-481.
- [9] YU J, CANG J, LU QW, FAN B, XU QH, LI WN, WANG XT. ABA enhanced cold tolerance of wheat 'dn1' via increasing ROS scavenging system[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(8): 1780403.
- [10] KOLUPAEV YE, KARPETS YV, KABASHNIKOVA LF. Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, 55(5): 441-459.
- [11] AHMAD P, JALEEL CA, SALEM MA, NABI G, SHARMA S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30(3): 161-175.
- [12] VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(1): 1-40.
- [13] 周希琴, 莫灿坤. 植物重金属胁迫及其抗氧化系统[J]. *新疆教育学院学报*, 2003, 19(2): 103-108.
- ZHOU XQ, MO CK. Heavy metal stress and its antioxidant system in plants[J]. *Journal of Xinjiang Institute of Education*, 2003, 19(2): 103-108 (in Chinese).
- [14] 赵叶舟, 王浩铭, 汪自强. 豆科植物和根瘤菌在生态环境中的地位和作用[J]. *农业环境与发展*, 2013, 30(4): 7-12.
- ZHAO YZ, WANG HM, WANG ZQ. The role of leguminous plants and *Rhizobium* in ecological environment[J]. *Agro-Environment and Development*, 2013, 30(4): 7-12 (in Chinese).
- [15] MA Y, RAJKUMAR M, LUO YM, FREITAS H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—effects on plant growth and Ni uptake[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 195: 230-237.
- [16] ABD-ALLA MH, BASHANDY SR, BAGY MK, ELSADK EL-ENANY AW. *Rhizobium tibeticum* activated with a mixture of flavonoids alleviates nickel toxicity in symbiosis with fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.)[J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23(5): 946-959.
- [17] MITRA S, GHOSE A, GUJRE N, SENTHILKUMAR S, BORAH P, PAUL A, RANGAN L. A review on environmental and socioeconomic perspectives of three promising biofuel plants *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata* and *Mesua ferrea*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2021, 151: 106173.
- [18] YU XM, KANG X, LI YM, CUI YL, TU WG, SHEN T, YAN M, GU YF, ZOU LK, MA MG, XIANG QJ, ZHAO K, LIANG YY, ZHANG XP, CHEN Q. Rhizobia population was favoured during in situ phytoremediation of vanadium-titanium magnetite mine tailings dam using *Pongamia pinnata*[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 255: 113167.
- [19] SCOTT PT, PREGELJ L, CHEN N, HADLER JS, DJORDJEVIC MA, GRESSHOFF PM. *Pongamia pinnata*: an untapped resource for the biofuels industry of the future[J]. *BioEnergy Research*, 2008, 1(1): 2-11.
- [20] SHEN T, JIN RM, YAN J, CHENG XR, ZENG L, CHEN Q, GU YF, ZOU LK, ZHAO K, XIANG QJ, PENTTINEN P, MA MG, LI SC, ZOU T, YU XM. Study on diversity, nitrogen-fixing capacity, and heavy metal tolerance of culturable *Pongamia pinnata* rhizobia in the vanadium-titanium magnetite tailings[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1078333.
- [21] PRAKAMHANG J, TITABUTR P, BOONKERD N, TEAMTISONG K, UCHIUMI T, ABE M, TEAUMROONG N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with

- Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 85: 38-49.
- [22] YUAN JC, LIU XX, ZHAO H, WANG Y, WEI X, WANG P, ZHAN JJ, LIU LS, LI FG, GE XY. GhRCD1 regulates cotton somatic embryogenesis by modulating the GhMYC3-GhMYB44-GhLBD18 transcriptional cascade[J]. *New Phytologist*, 2023, 240(1): 207-223.
- [23] 李文誉, 李德明. 盐碱及重金属对植物生长发育的影响[J]. *北方园艺*, 2010(8): 221-224.
- LI WY, LI DM. Effects of salinization and heavy metals stress on plant growth and development[J]. *Northern Horticulture*, 2010(8): 221-224 (in Chinese).
- [24] MAJEED A, AMJAD M, IMRAN M, MURTAZA B, NAEEM MA, JAWAD H, QAISRAANI SA, AKHTAR SS. Iron enriched quinoa biochar enhances Nickel phytoremediation potential of *Helianthus annuus* L. by its immobilization and attenuation of oxidative stress: implications for human health[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2023, 25(13): 1830-1843.
- [25] ZHOU XF, CHEN SL, WU H, YANG Y, XU HW. Biochemical and proteomics analyses of antioxidant enzymes reveal the potential stress tolerance in *Rhododendron chrysanthum* Pall[J]. *Biology Direct*, 2017, 12(1): 1-9.
- [26] LÓPEZ CM, ALSEEKH S, TORRALBO F, RIVAS FJM, FERNIE AR, AMIL-RUIZ F, ALAMILLO JM. Transcriptomic and metabolomic analysis reveals that symbiotic nitrogen fixation enhances drought resistance in common bean[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(10): 3203-3219.
- [27] JACH ME, SAJNAGA E, ZIAJA M. Utilization of legume-nodule bacterial symbiosis in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils[J]. *Biology*, 2022, 11(5): 676.
- [28] MOTAMEDI M, ZAHEDI M, KARIMMOJENI H, MOTAMEDI H, MASTINU A. Effect of rhizosphere bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of *Medicago sativa* L. subjected to herbicide stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2022, 44(8): 1-12.
- [29] HUSNA H, HUSSAIN A, SHAH M, HAMAYUN M, LQBAL A, QADIR M, ASIM S, LEE IJ. *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium solani* improved antioxidant system of soybean under chromate stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1001847.
- [30] AHMAD P, JALEEL CA, AZOOZ MM, NABI G. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants[J]. *Botany Research International*, 2009, 2(1): 11-20.
- [31] 韩蕾蕾, 王红霞, 李阳, 张乐乐, 袁祖丽. 丛枝真菌调节类黄酮和 NO 的水平减轻镉胁迫对小麦幼苗的氧化伤害研究[J]. *河南农业大学学报*, 2021, 55(2): 221-226.
- HAN LL, WANG HX, LI Y, ZHANG LL, YUAN ZL. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate oxidative damage by regulating the levels of flavonoids and NO in wheat seedling under cadmium stress condition[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2021, 55(2): 221-226 (in Chinese).
- [32] GILL SS, 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.
- [33] SHOAIB M, HUSSAIN S, CHENG XR, CUI YL, LIU H, CHEN Q, MA MG, GU YF, ZHAO K, XIANG QJ, ZHOU J, LIU JH, LI SC, ZOU T, YU XM. Synergistic anti-oxidative effects of *Pongamia pinnata* against nickel mediated by *Rhizobium pisi* and *Ochrobacterium pseudogrignonense*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 217: 112244.