



评述

植物根瘤共生固氮研究进展与展望

高英志^{1,2*}, 任健¹

1. 东北师范大学草地科学研究所, 吉林松嫩草地生态系统国家野外科学观测研究站, 国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室, 植被生态科学教育部重点实验室, 长春 130024

2. 新疆农业大学草业学院, 西部干旱荒漠区草地资源与生态教育部重点实验室, 乌鲁木齐 830052

* 联系人, E-mail: gaoyz108@nenu.edu.cn

收稿日期: 2024-01-17; 接受日期: 2024-06-19; 网络版发表日期: 2024-10-16

新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(批准号: 2023E01008)和国家自然科学基金(批准号: 32271579)资助

摘要 根瘤共生固氮是宿主植物与微生物在共生过程中形成固氮“器官”根瘤的固氮方式, 这包括豆科植物与根瘤菌(*Rhizobia*)共生固氮和放线菌结瘤植物与弗兰克氏菌(*Frankia*)共生固氮。每年由根瘤共生固氮所固定的氮将近 2.59×10^7 吨, 约占陆地生态系统总生物固氮量的29.4%, 这其中豆科植物与根瘤菌所形成的共生体系固氮效率最高, 创造的生态与经济价值最广。根瘤在系统发生及遗传发育上具有十分复杂的属性, 这不仅体现在根瘤仅存在于“固氮结瘤分支”且不同的结瘤谱系镶嵌分布在豆目、葫芦目、壳斗目和蔷薇目中, 也刻录在豆科植物与放线菌结瘤植物根瘤结构的差异上, 这决定不同结瘤谱系的进化走向。近期根瘤共生固氮领域在共生固氮进化、生物遗传发育、光环境调控和碳能量因子调控等方面都取得重要进展。未来应加强放线菌结瘤植物根瘤共生固氮机制、根瘤共生固氮生态地理学、共生固氮微生物与植物互作机制、基因编辑与合成生物学等相关的研究工作。这些研究旨在未来更好地利用根瘤共生固氮, 创建绿色可持续农业发展提供应用和理论依据。

关键词 根瘤菌, 弗兰克氏菌, 根瘤共生固氮, 固氮结瘤分支, 系统进化

尽管大气中氮气的体积分数占比高达78%, 然而如此丰富的氮植物却无法直接利用^[1]。在自然环境下, 氮气只可以被一些固氮原核生物还原为氨, 这个过程被称为生物固氮^[2]。目前, 已知3种生物固氮类型分别为自生型、联合型和共生型^[3,4]。在自生型固氮中, 固氮菌固定的氮供自己使用, 并在微氧或厌氧条件下将氮释放到环境中^[5]。在联合型固氮中, 一些生活在植物宿主根际、叶面或组织间隙中的固氮菌, 利用植物光合作用的产物作为碳源进行固氮^[6]。共生型固氮是指固氮微生物在与宿主共生时才能进行固氮作用^[7]。由

于共生型固氮的固氮效率明显优于其他两种类型, 因此该领域的研究一直是学界和产业界高度关注的焦点^[3,8-11]。

根据植物根瘤器官的存在状态, 植物共生固氮作用可分为无根瘤共生固氮和有根瘤共生固氮2种类型^[12]。无根瘤类型共生固氮是指在共生过程中并不出现明显的固氮“器官”, 即没有根瘤, 代表案例为蓝细菌的共生固氮作用^[13]。有根瘤类型共生固氮是指在共生过程中通常在植物根系上长出根瘤。有根瘤类型共生固氮按照共生微生物的不同也可分为2种类型, 即

引用格式: 高英志, 任健. 植物根瘤共生固氮研究进展与展望. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 131–145

Gao Y Z, Ren J. Advances and prospects in plant root nodule symbiotic nitrogen fixation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 131–145, doi: 10.1360/SSV-2024-0014

放线菌结瘤植物与弗兰克氏菌共生固氮和豆科植物与根瘤菌共生固氮^[3,14]。

在植物共生固氮中, 2种类型的共生固氮均在自然界发挥着重要的功能。对于非根瘤共生固氮的蓝细菌, 其在地球上分布广泛, 许多隐花植物可以与蓝细菌形成生物结皮进而共生固氮^[15,16]。这种共生固氮作用是干旱/半干旱和寒冷地区(如荒漠、草地和冻土)等极端环境地区氮素的重要来源, 对维护当地生态系统健康与安全起到非常关键的作用^[17,18]。对于根瘤共生放线菌植物, 其生活型除野麻科(Datisceae)为草本外, 其他均为多年生木本、灌木与乔木^[12,19]。放线菌结瘤植物主要分布在纬度较高的温带和北方森林, 是干旱区、森林和湿地的主要氮源^[20]。对于根瘤共生豆科植物, 它们是目前已发现的固氮效率最高, 应用最广泛的共生模式^[21]。在自然生态系统中, 豆科植物共生固氮有助于促进土壤肥力提升。通过固氮作用, 豆科植物能够将大气中的氮气转化为植物可利用的氮化合物, 从而显著拓展植物对氮素的利用能力^[22]。这不仅使得豆科植物能在氮素贫瘠的土地上生存, 还为其他植物提供有效氮源, 推动生态系统的演替发展、健康和平衡^[12,23-25]。此外, 豆科植物共生固氮在农业和生态修复方面也具有广泛的应用前景^[2,22,26]。在农业生产上, 根瘤菌和豆科植物共生体可以有效缓解因滥用氮肥所造成的环境污染和能源浪费^[27]。使用豆科植物作为绿肥或者与其他农作物进行间套作以及轮作, 可以减少大约30%的氮肥使用^[28-30], 降低农业生产成本, 同时减缓施用氮肥对土壤和水体的污染^[31]。豆科植物与禾本科作物间作还能显著提高土地当量比, 促进氮磷等营养元素吸收, 增加作物产量, 有效提高间作复合群体经济效益^[32-34]。在生态修复方面, 通过根瘤共生固氮, 可以修复因人为活动或自然灾害导致的氮素贫瘠土地, 为生态系统恢复提供有力氮源支持^[22,35,36]。

综上, 根瘤共生固氮在全球氮可持续性 & 农业绿色发展发挥着重要作用。然而, 目前很多对根瘤共生固氮的综述多局限于豆科植物为对象的分子调控研究, 以根瘤共生固氮生态进化整体视角综述的文章十分匮乏。因此, 本文将豆科植物根瘤固氮及放线菌植物根瘤固氮结合, 系统阐述根瘤共生固氮对生态系统的氮贡献, 明确其在系统发育树中的位置及分布模式, 明晰不同共生固氮根瘤的差异, 阐明近期研究的重要突破, 并指明该领域研究的重要方向及应用前景, 为

将来更好的利用根瘤共生固氮和创建绿色可持续农业发展提供理论依据。

1 根瘤共生固氮对生态系统的氮贡献

氮素是最重要的植物营养三要素之一, 是决定作物生长发育、产量和品质的最关键元素。土壤氮素是土壤肥力中最活跃的因素, 也是自然生态系统和农业生产中最重要的限制因子^[37,38]。然而, 在工业固氮技术出现之前, 自然界中的非生物固氮只能通过雷电完成。哈伯-博施固氮反应的出现虽极大促进人工固氮的发展, 解决粮食生产过程中土壤氮素需求困境, 但也引发氮肥滥用所导致的环境污染等生态问题^[39,40]。生物固氮对自然界氮素循环、自然生态系统稳定和发展都有着十分重要的意义。根据目前已发表的研究数据, 比较准确的生物固氮量估计为全球每年 2.28×10^8 吨, 是工业固氮量的1.52倍^[41,42]。这其中由海洋生态系统参与的固氮量为 1.40×10^8 吨, 占全球总生物固氮量的61.4%, 由陆地生态系统参与的固氮量为 8.80×10^7 吨, 占全球总生物固氮量的38.6%^[43]。在陆地生态系统中根瘤共生固氮为 2.59×10^7 吨, 约占陆地生态系统总生物固氮量的29.4%^[5,35,42](图1)。在根瘤共生固氮中, 豆科植物与根瘤菌共生固氮高达 2.15×10^7 吨, 占总根瘤共生固氮量的83.0%, 放线菌植物根瘤共生固氮为 4.40×10^6 吨, 占总根瘤共生固氮量的17.0%(图1)。

不同生物固氮类型固氮能力的大小与其固氮量密切相关, 其固氮能力是指在单位时间内固氮植物和固氮微生物在单位面积通过生物固氮累积的固氮量^[44]。广泛的研究证明自生型、联合型和共生型3种生物固氮类型具有不同的固氮量^[16,35,42,45]。这其中共生固氮的固氮量最高, 自生固氮的固氮量最低, 联合固氮的固氮量介于两者之间(图2)。导致固氮量差异的原因与它们的固氮方式密切相关^[11]。自生固氮菌是指能独立进行固氮作用的某些细菌。它们以分子态氮为氮素营养, 将其还原为氨, 最终合成蛋白质。由于自生固氮不依靠宿主植物就可以自行固氮, 固氮过程更易受到外界环境条件影响, 固氮菌本身独立创造适合且稳定的固氮条件难度大, 导致其固氮效率低下。对某些异养细菌固氮量的研究表明其每年的固氮量仅为 2.5 kg/hm^2 ^[46](图2)。联合固氮为自生固氮与共生固氮的中间类型, 微生物与植物之间具有较为密切的关系, 但不形成特化结构。

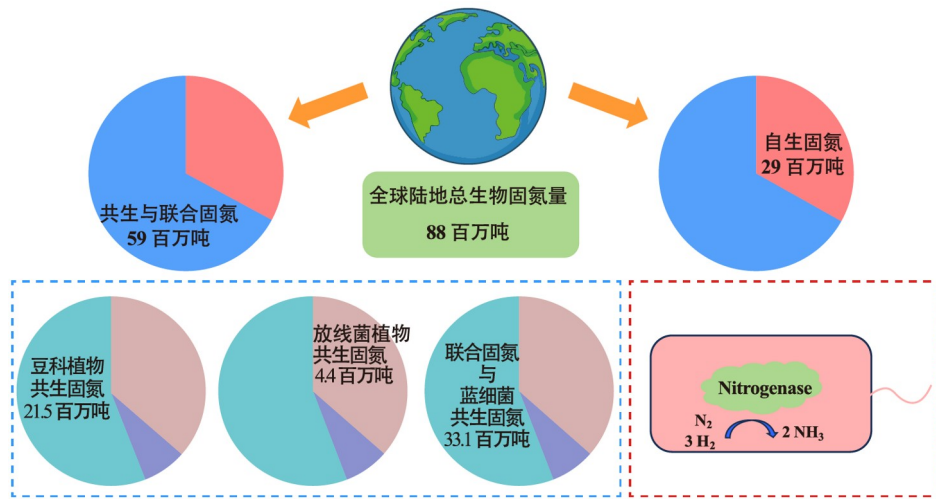


图 1 全球陆地生态系统中不同生物固氮类型固氮量与陆地总生物固氮量的关系^[5,43]

Figure 1 Relationship between the amount of nitrogen fixation by different types of biological nitrogen fixation in global terrestrial ecosystems and the total biological nitrogen fixation^[5,43]

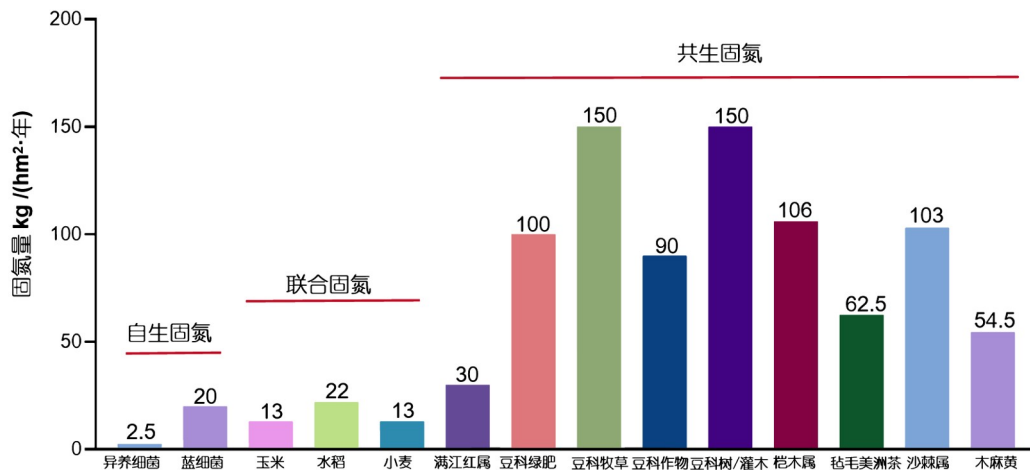


图 2 不同生物固氮类型单位固氮量与固氮类型的关系^[46-49]. 固氮量为该固氮类型最常见测定值范围的均值

Figure 2 Relationship between the nitrogen fixation rates of different types of biological nitrogen fixation and other types of nitrogen fixation^[46-49]. Amount of nitrogen fixation represents the mean value of the most commonly measured range for each type of nitrogen fixation

全球玉米、水稻和小麦固氮量评估的研究表明, 它们的每年固氮量介于13~22 kg/hm²^[47](图2). 共生固氮是指固氮菌必须与植物共生的情况下方可进行固氮或有效固氮, 固氮生成的产物氨可直接为共生体提供氮源. 由于在共生固氮中植物宿主为固氮菌提供稳定适宜的固氮环境, 例如进化出固氮“器官”根瘤, 这极大地提升固氮菌的固氮效率. 豆科植物在共生固氮中拥有最高的固氮效率, 一些豆科牧草和豆科树每年的平均固氮量为150 kg/hm²^[21,48,49](图2). 因此, 根瘤共生固

氮在维持生态系统的氮循环和环境稳定中起到至关重要的作用, 也对生态平衡和可持续发展具有深远影响^[12,22,26,35].

2 根瘤共生固氮宿主植物在系统发育树中的位置及分布模式

由于根瘤共生固氮是陆地自然生态系统氮输入最重要的途径, 因此探究它的起源和系统发育对充分认

知和利用根瘤共生固氮具有重要的生态学意义^[50,51]。大量的研究表明微生物与植物共生时, 随着共生固氮类型不同植物宿主的范围会有很大的差异^[52,53]。与蓝细菌共生的植物宿主范围较为广泛, 例如苔藓植物(苔类和角苔类植物)、蕨类植物(*Azolla*属)、裸子植物(苏铁科)和被子植物(大叶草科)^[3,13,15,54]。然而与根瘤菌和放线菌共生的植物分布范围却较为狭窄, 它们均有着共同的属性, 即都属于被子植物的Rosid I 支系^[55-57]。

目前, 所有已知的根瘤共生只存在于10个科, 它们镶嵌分布在豆目(Fabales), 葫芦目(Cucurbitales), 壳斗目(Fagales), 蔷薇目(Rosales)中, 这些目在系统发育中被称为“固氮结瘤分支”^[51](图3A)。根瘤菌类型结瘤发生在固氮结瘤分支内的2个科, 即豆科与大麻科(Cannabaceae)^[58](图3A和B)。在豆科的所有亚科中存在结瘤的谱系为云实亚科(Caesalpinioideae)和蝶形花亚科(Papilionoideae), 对于剩余的所有亚科, 紫荆亚科(Cercidoideae)、甘豆亚科(Detarioideae)、山姜豆亚科(Du-

parquetioideae)、酸榄豆亚科(Dialioideae)并不存在结瘤^[59](图3B)。这里需要特别指出, 山黄麻属(*Parasponia andersonii*)是目前唯一已知与根瘤菌结瘤的非豆科植物^[11,60]。放线菌类型结瘤发生在固氮分支内的8个科, 即杨梅科(Myricaceae)、桦木科(Betulaceae)、木麻黄科(Casuarinaceae)、马桑科(Coriariaceae)、野麻科(Datisceae)、鼠李科(Rhamnaceae)、胡颓子科(Elaeagnaceae)和蔷薇科(Rosaceae)^[12](图3)。

根瘤共生固氮植物在固氮结瘤分支中的分布并不均匀, 其在豆目中的物种丰富程度远高于葫芦目、壳斗目和蔷薇目。Soltis等人^[57]提出两种假说来解释这种情况: (i) 在固氮结瘤分支的基部存在单一的结瘤起源, 随后多次丧失; (ii) 随着谱系的进化和多样化, 出现多个结瘤起源。考虑到根瘤共生固氮植物的多样性, 多起源结瘤假说一直是被关注的重点^[56]。直到最近随着比较基因组学及系统发育学的发展, 越来越多的证

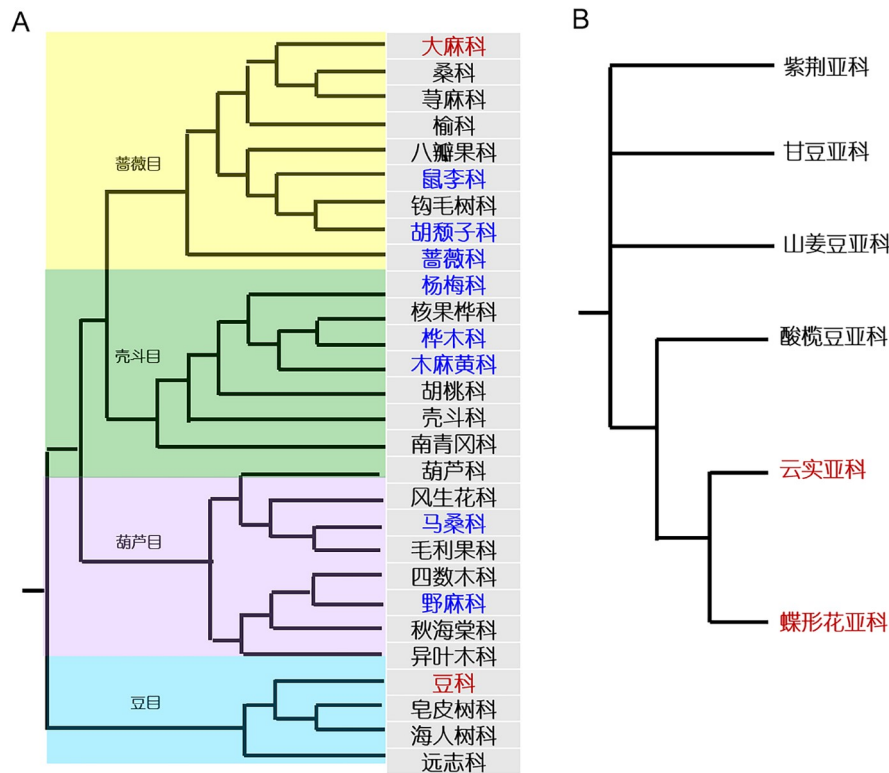


图3 固氮结瘤分支与豆科植物6个亚科的系统发育分析^[50]。A: 固氮结瘤分支; B: 豆科植物的6个亚科系统发育分支; 红色代表存在根瘤菌结瘤的分支, 蓝色代表存在放线菌结瘤的分支

Figure 3 Phylogenetic analysis of the nitrogen-fixing nodulation clade and six legume subfamilies^[50]. A: The nitrogen-fixing nodulation clade; B: the phylogenetic branches of the six legume subfamilies. Red indicates branches with rhizobia nodulation, and blue indicates branches with *Frankia* nodulation

据支持结瘤单起源假说. 此外, 当前许多相关物种缺乏结瘤的现象可能是因为过去1亿年中大气二氧化碳浓度下降, 固氮的收益相对于碳的成本降低所致^[61]. 固氮微生物与植物共生的多样性及其在特定植物类群中的独特分布, 展现生物进化过程中共生关系的复杂性和专一性, 也反映出系统生物发育与进化之间的深刻联系^[62].

3 根瘤共生固氮在根瘤结构上的差异及对进化的影响

根瘤共生固氮植物在进化发育树上的分布模式, 在一定程度上受到放线菌结瘤植物与豆科植物根瘤结构差异的影响^[12,63]. 根瘤作为共生植物特殊的“器官”, 其在共生固氮的过程中发挥着非常重要的作用, 每个根瘤犹如固氮的工厂为植物的生长发育提供源源不断的氮素^[64]. 不同类型的根瘤共生, 根瘤的生长发育及形态具有很大的区别. 对于豆科植物根瘤, 它可以分为定型根瘤及不定型根瘤^[65](图4). 定型根瘤产生于外皮层细胞, 在根瘤成熟后便不再继续发育. 相比之下, 在不定型根瘤的发育过程中, 内皮层和中皮层细胞以及中柱鞘都被有丝分裂激活, 每个根瘤顶端的皮层分生组织随着根瘤的生长继续分裂. 同样, 放线菌结瘤植物与豆科植物的根瘤也存在很大的差异^[19]. 放线菌结瘤植物的根瘤起始于中柱鞘细胞的分裂, 它们是包含维管组织且具有中柱的改良侧根, 而豆科植物的根瘤起源于去分化的皮层细胞, 具有外围维管系统而不是中央维管系统^[12].

豆科植物与放线菌植物根瘤结构不同会造成它们之间的固氮效率差异^[12,66]. 结瘤在豆科植物中非常普遍, 根瘤维管束的外围位置被认为是豆科植物结瘤如此成功的原因之一^[63]. 豆科植物的根瘤拥有外围而非中央的维管组织, 并普遍利用豆血红蛋白来控制氧气浓度, 从而创造出一个无需细菌控制氧张力的根瘤环境^[61]. 然而放线菌结瘤植物的中央维管束, 却难以做到这一点. 由于维管组织被大量消耗氧气的感染细胞包围, 同时, 这些感染细胞中的豆血红蛋白有助于在低氧浓度下将氧气传输到线粒体, 这进一步减少氧气供应给根瘤维管细胞^[63]. 由于缺乏氧气摄取, ATP的产生难以满足根瘤维管生长的能量需求, 这使得放线菌结瘤植物在进化上处于不利地位. 自然界中已发现的放线菌结瘤植物物种数显著低于豆科结瘤植物物种数, 这似乎证明放线菌结瘤植物在进化上的不足, 但它们独特的根瘤发育机制及关键的生态修复功能, 为未来的生态工程和持续性农业提供重要的生物学资源^[12].

4 根瘤共生固氮领域近5年研究重要突破

近些年随着科研人员的不懈努力以及新技术的快速应用, 科学家对根瘤共生固氮的认识达到前所未有的高度. 例如, 杨军等人^[8]对豆科植物与根瘤菌共生固氮分子调控领域进行全面的综述. 本文旨在梳理最近5年根瘤共生固氮领域的重要突破, 重点关注根瘤共生固氮的进化与根瘤建成过程、光反应与碳能量对根瘤的生长调控、单细胞测序技术的应用以及放线菌结瘤植物基因组等几个方面的研究.

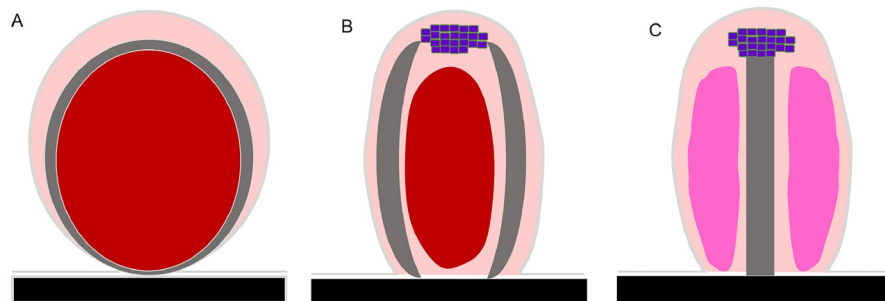


图4 豆科结瘤植物根瘤与放线菌结瘤植物根瘤发育结构的比较. 灰色代表维管束. A: 豆科植物定型根瘤; B: 豆科植物不定型根瘤; C: 放线菌结瘤植物根瘤; 紫色代表分生组织, 红色和粉色代表固氮区

Figure 4 Comparison of the developmental structures of root nodules in legumes and actinorhizal plants. A: Determinate legume nodules; B: indeterminate legume nodules; C: nodules of actinorhizal plants. Gray represents vascular bundles, purple represents meristematic tissue, and red and pink represent nitrogen-fixing zones

4.1 根瘤共生固氮进化研究

目前普遍认为根瘤起源于1.1亿年前的结瘤祖先, 在6700万年前豆科植物祖先发生系统分化. 利用全面的系统发育分析并结合分子生物学技术, 研究发现结瘤只发生在结瘤固氮分支祖先1次, 随后大多数后代由于结瘤关键基因*NIN*(Nodule Inception)和*RPG*(Rhizobium-directed Polar Growth)的缺失或假基因化(pseudogenization), 使结瘤性状大量丧失^[50,51,61,67]. 豆科植物根瘤共生与放线菌植物根瘤共生可能具有一个共同的结瘤祖先, 结瘤过程可能涉及招募不同的基因调控网络模块^[10,52,68]. 豆科植物根瘤共生的形成可能遵循如下的进化顺序, 即从最原始的菌根共生到放线菌根瘤共生再到豆科植物根瘤共生^[50,61,69].

4.2 根瘤建成研究

SHR-SCR(Shortshoot and Scarecrow)作为GRAS基因家族的重要成员, 它对根系的生长发育至关重要^[70,71]. 豆科植物与根瘤菌共生关系的成功建立依靠豆科植物根皮层细胞的独特特性. 研究发现位于蒺藜苜蓿根皮层细胞的MtSHR-MtSCR模块赋予皮层细胞对共生信号做出反应的能力, 使它们能够在接收到信号时恢复到未分化的状态. MtSHR-MtSCR模块是皮层细胞对细胞分裂素和*NIN*响应并进行分裂所必需的. 此外, 根瘤的发生也涉及侧根的发育程序^[72~74]. 研究发现, *NIN*会启动皮层细胞分裂并调控LBD16(lateral organ boundaries domain 16). LBD16基因在侧根发育中起关键作用, 其与Nuclear Factor-Y(NF-Y)共表达可以部分抑制结瘤缺陷. *NIN*通过调控LBD16和NF-Y, 将侧根发育程序整合到根瘤形成过程中, 从而促进根瘤共生. 最近, 在蒺藜苜蓿中还发现2个关键的转录因子LSH1/LSH2, 它们招募一个进入根皮层的程序, 促使能容纳根瘤菌细胞的产生, 赋予根瘤关键的特征^[75]. 这些结果加深研究者对根瘤发生调控的理解, 为未来提升根瘤固氮效率、设计新型固氮植物提供思路.

4.3 根瘤共生固氮光环境调控研究

光是根瘤共生发育及生物固氮的必须环境因子^[76]. 光可以驱动氮的固定, 但光是如何调控寄主与根瘤菌的互作, 从而调控氮固定的机制仍然未知^[77]. 最近的研究发现一个光诱导的移动信号, 可以与根瘤

菌激活的信号共同促进根瘤形成. 在大豆中由光诱导结瘤的分子过程如下: 光诱导GmFTs和GmSTF3/4的表达, 使其从地上部转移到地下部, 在根系中共生信号关键组分CCaMK将GmSTF3/4磷酸化, 促进GmSTF3/4与GmFTs互作, 进而启动结瘤程序, 诱导根瘤形成^[78]. 此外, 近期在大豆中又发现2个光调控模块, GmUVR8-GmSTF3和GmCRY1s-STF1/2. 前者响应UV-B光, 而后者对蓝光敏感, 这两个模块丰富并调节从光信号到结瘤的分子过程^[79,80]. 光调控共生固氮机制的发现阐明豆科植物中光信号如何独特地调节根瘤发育的分子机制, 说明合理的光照对根瘤形成的重要性, 这为未来优化豆科作物的固氮效率开辟新的方向.

4.4 根瘤共生固氮碳能量分子调控研究

由于根瘤发育和固氮还原反应都是高耗能的过程, 豆科植物如何根据环境和自身的碳氮状态来调控根瘤发育和成熟根瘤的固氮能力, 从而平衡生物固氮过程以及其它生命活动之间的碳消耗, 这一直是共生固氮领域中的关键问题. 最近, 在大豆中新发现的能量感受器蛋白GmNAS1和GmNAP1会感知由根瘤碳源增加所带来的能量提升, 进而调控糖酵解中间产物磷酸烯醇式丙酮酸在根瘤细胞中的分配方向, 促使磷酸烯醇式丙酮酸转化为苹果酸为根瘤供能, 最终提升根瘤共生体的固氮能力, 这从碳能量分子调控因子的新视角阐明根瘤共生固氮的新机制^[81].

4.5 根瘤共生固氮单细胞研究

利用单细胞测序技术科学家成功揭示以蒺藜苜蓿为代表的成熟不定型根瘤中不同转录表达模式的细胞类群, 以及共生细胞类型和非共生细胞类型的分化轨迹和生物学功能^[65,82]. 研究发现固氮细胞将氮同化为谷氨酰胺, 非固氮细胞将谷氨酰胺转化为天冬酰胺供植物生长的固氮新机制以及共生早期信号识别的动态转录变化. 此后, 以百脉根为代表的定型根瘤单细胞转录表达谱以及促进百脉根根瘤菌感染的新基因的发现大大促进研究者对定型根瘤共生发育的理解^[83,84]. 最近, 通过生成大豆根和根瘤的单细胞转录组图谱, 注释得到17种主要细胞类型, 这其中包括6种特定于根瘤的细胞类型. 这些细胞类型在大豆氮同化所依赖的尿苷合成途径中具有特定作用, 有助于大豆氮固定过程中生化反应的空间隔离^[85]. 在大豆根瘤的中央感染

区域, 研究还发现未感染细胞在根瘤发展过程中专化成不同的功能亚组, 并揭示一种具有丰富结瘤相关基因的感染细胞过渡亚型^[86]. 苜蓿与大豆氮同化过程中依赖化合物的不同, 表明它们之间特定的代谢途径和生理机制. 单细胞测序技术的应用使研究者对根瘤共生的认识发展到细胞层次, 极大地助力对根瘤共生精细化调控的深入研究.

4.6 放线菌结瘤植物基因组研究

由于放线菌结瘤植物多为生长周期长的灌木和乔木且基因组信息缺乏, 使人们对它们共生固氮的研究远远落后于豆科植物根瘤共生固氮的研究. 放线菌结瘤植物常见的研究领域多集中在根瘤菌与丛枝根真菌的共享信号途径, 即利用已知的在豆科植物中起关键调控作用的元件发掘或验证在放线菌结瘤植物中的功能^[3]. 近些年随着基因组技术的发展, 放线菌结瘤植物基因组资源得到一定的挖掘, 这极大的促进对放线菌结瘤植物的研究. Wu等人^[87]结合短读、长读和Hi-C测序技术, 构建胡颓子科沙棘(*Hippophae rhamnoides*)染色体水平的参考基因组(骨架N50: 65 Mb, 基因组大小: 730 Mb), 并预测主要位于12条伪染色体上的30812个蛋白质编码基因. 高质量基因组的破译使沙棘成为未来研究放线菌结瘤植物根瘤共生的优秀模式植物. 此外, Zhang等人^[52]进一步丰富固氮结瘤分支中物种的基因组信息. 他们构建放线菌非结瘤植物欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)和仙女木(*Dryas octopetala*)以及放线菌结瘤植物羚梅(*Purshia tridentata*)的基因组. 这些新测序的基因组不仅增强现有数据的系统发育多样性, 还为未来更强大的比较分析提供相关的结瘤/非结瘤对.

5 根瘤共生固氮未来研究重要领域

目前, 尽管在根瘤共生固氮研究领域发展迅速, 但未来仍有很多未澄清问题和出现的新问题值得研究者去探索和回答, 研究需要主要聚焦和发展以下重要方向.

5.1 生物固氮速率快速准确量化方法研究

在生物固氮量化评估方面, 当前的方法可分为快速、实时和基于N同位素的定量方法^[88]. 这些方法虽取得一些进步, 但它们仍然需要专门的分析和采样设

备, 如收集和监测气体浓度的培养室, 这并不利于在田间条件下测定, 使得这些测定技术的推广应用受到限制. 因此, 开发一种经济便捷、灵敏准确且适用于野外大尺度和长时间序列监测的生物固氮速率量化方法对分析生物固氮机理及比较固氮差异尤为重要, 这不仅依托于传统实验方法对新方法结果的校正, 也需要在测定理论及靶标分析上给予创新^[89].

5.2 基因编辑与合成生物学研究

利用基因编辑与合成生物学技术似乎是将非豆科植物工程化, 并使其具有固氮能力的有效方法^[1,9]. 然而, 这要求研究者拥有一份开启根瘤发育并最终形成有效共生固氮反应的详细分子蓝图. 研究者需要先确定哪些是根瘤发育与共生固氮的核心基因集并要解决基因转导后禾本科植物对新建共生作用的排斥与权衡. 尽管最近来自*Paenibacillus*的最小固氮基因簇在拟南芥中的成功表达, 但仍有一些问题值得人们去解决^[5,40,90,91]. 例如: 假定禾谷类作物已转入最小固氮基因簇, 如何在特定的植物组织和器官中诱导该固氮基因簇的高效表达? 固氮酶对氧气具有很高的敏感性, 如何在转基因植物组织或器官中调节局部的氧浓度以克服固氮酶的氧敏感性?

5.3 共生固氮微生物与植物互作研究

在共生植物的根际中不仅存在根瘤菌与放线菌, 也存在其他重要的微生物, 土壤微生物之间复杂的交互关系给植物的根际生态系统带来复杂的生理生态学变化, 这不仅维持植物的健康并塑造植物的性状^[92,93]. 因此, 研究者在豆科结瘤植物和放线菌结瘤植物共生研究中需要将根瘤共生固氮菌与其他细菌或真菌的互作效应纳入研究体系^[49,94,95]. 例如, 丛枝根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)通过菌丝来高效传输养分, 能促进固氮菌之间的养分交流或异养非固氮菌的生长, 进而调节固氮菌群落^[96]. AMF和根瘤能形成互惠互利关系, 根瘤不仅通过固氮作用为AMF的生长和发育提供氮源, 还能促使宿主植物的根系分泌黄酮类物质, 诱导AMF定殖并促进丛枝结构的生长, 进而提高植株根系的菌根侵染率^[97,98]. 而AMF的侵染能为根瘤菌和植物提供磷和其他营养元素, 增强宿主植物光合作用进而增加根系光合碳, 同时诱导结瘤基因(Nod)的表达, 最终能提高宿主植物结瘤和固氮能

力^[99,100]。此外, AMF还能吸收豆科植物释放的氮并转移至非豆科植物中^[101]。例如, AMF侵染植物根系后, 通过分泌独角金内酯信号分子诱导AMF释放LCOs, 也称为菌根(Myc)因子, 与Nod因子一样, Myc因子被植物感知触发与根瘤菌共生相似的信号通路。Myc因子通过AMF细胞内的Ca²⁺介导从而诱导寄主植物根系相关基因的表达, 促进菌丝的大量繁殖、增加孢子的萌发, 之后菌丝表面积的增加扩大植物与AMF的接触面积, 利于AMF与宿主植物的信号交换, 进而诱导宿主植物与AMF共生^[69,102]。同时也需要关注豆科植物根际中根瘤菌、植物促生细菌(PGPR)及菌根真菌利用哪些机制协调应对外界环境胁迫? 它们之间对促进豆科植物氮、磷吸收的贡献百分率分别是多少? 重点研究豆科植物与禾本科植物根系交互体系下, 根系分泌物、不同营养元素(氮、磷、铁、钼、硼等)、以及不同微生物类群对共生固氮体系的影响^[91,103-106]。在禾豆根系交互过程中, 禾本科物种引入会对固氮体系造成显著影响。一方面, 禾本科的根系分泌物可能会刺激豆科植物根系中类黄酮及生长素相关基因的表达, 介导类黄酮及生长素的运输与代谢, 最终影响根瘤的发育及固氮体系的建立^[93,107]。这需要广泛利用组学手段探究在根系交互条件下豆科植物根系的转录水平、代谢水平及根际土壤的微生物群落随着不同邻居禾本科植物的加入会对整个固氮体系造成哪些积极或消极的影响, 以及介导这些影响的生物途径^[92,108,109]。另一方面, 禾本科与豆科根际微生物组的相互作用, 可能会改变微生物组的 α 多样性及 β 多样性, 打破原根际微生物组的平衡, 最终影响宿主的结瘤过程^[92,105,108,110]。

5.4 放线菌结瘤植物根瘤共生固氮机制研究

放线菌结瘤植物不仅在生境早期演替中发挥关键的生态作用而且蕴含的固氮潜力同样不容忽视。例如: 桤木属及沙棘属植物具备与豆科植物相似甚至更高的固氮量, 据报道欧洲红桤木(*Alnus rubra* Bong.)的根瘤在生长季中, 每年每公顷的固氮量甚至可以达到300 kg, 这远高于三叶草和大豆的固氮量^[35]。然而, 对于放线菌结瘤植物根瘤共生固氮的研究却远远落后于豆科植物。放线菌结瘤植物根瘤共生作为豆科植物根瘤共生进化的先行者, 对研究豆科植物根瘤共生提供非常重要的蓝本, 相反, 豆科植物相对成熟的研究体系也对进一步研究放线菌结瘤植物固氮提供契机^[12]。

对于放线菌结瘤植物根瘤固氮的研究仍有许多基本问题值得人们探索^[35], 例如: 哪些环境、植物和微生物遗传特征决定放线菌结瘤植物根瘤共生的固氮效率? 放线菌结瘤植物是改善还是抑制它们与非固氮植物的联系, 有多少氮可以转移到生长在放线菌结瘤植物附近的非固氮植物? 如何在生态系统和景观水平上准确评价放线菌结瘤植物对土壤恢复和植物修复以及随后的植被演替的贡献?

5.5 根瘤共生固氮生态地理学研究

根瘤共生固氮植物在全球的分布并非均匀, 其分布受到诸多环境因素的影响。在全球极端气候频发和土地利用变化的大背景下, 很多重要的根瘤共生固氮生态地理学问题值得研究者进一步深入研究^[20,111]。研究根瘤共生固氮微生物资源和根瘤共生固氮植物资源全球的分布模式, 并对高共生固氮能力的植物和土壤微生物资源进行挖掘和保护; 研究全球变化背景下根瘤共生固氮微生物和根瘤共生固氮植物的适应性策略及全球范围内的分布响应模式^[20]。当前评估不同陆地生态系统自生固氮以及共生固氮量时, 不同文献数据存在很大的差异和误差, 为解决当前数据之间所存在的矛盾问题, 需要对全球不同陆地生态系统固氮能力和固氮量重新评估^[5,8,35,42,43]。全球不同陆地生态系统中在缺乏共生固氮植物时, 自生固氮是植物氮素的重要来源, 固氮微生物多样性和固氮功能因其生态位宽度不同而异^[112], 那么地理因子和气候因子如何通过土壤理化性质直接或间接地影响 $nifH$ 基因丰度和固氮微生物多样性, 以及特有种(specialists)和机会种(opportunists)固氮微生物类群的丰度, 进而影响土壤固氮速率^[113]。更为重要的是也需要探明共生固氮和自生固氮对整个生态系统氮素输入的相对贡献。

5.6 养分管理与可持续农业研究

在施肥管理方面, 建立不同共生固氮作物与不同营养元素(氮、磷、铁、钼、硼等)的协调促生关系, 利用高效养分管理实现共生固氮农业应用的最大化。例如, 在土壤磷有效性缺乏下, 施用磷肥能促进土壤磷酸酶的活性, 促进土壤有机磷矿化, 增加作物磷可利用库, 进而促进共生固氮作物的固氮效率, 提高农业生态系统的氮营养^[114,115], 在未来开发高共生固氮能力、高磷利用效率的共生固氮作物是可持续农业发展的方

向^[116]。除磷肥外,施用纳米态铁肥和钼肥将具有更高的养分利用效率,并增加共生固氮植物的生物固氮效率也是重要的研究方向^[117,118]。在根瘤菌资源挖掘和利用方面,发掘高效固氮根瘤菌,丰富根瘤菌种质资源,研究根瘤菌与不同豆科作物的共生匹配性,将高效固氮的植物与专一性菌种配对组合并广泛应用于农业生产。在种植管理方面,针对禾本科和豆科的不同间作策略,在各生态区根据当地耕作习惯,加强诸如不同作物间作、轮作、混作和复种等栽培模式的研究,包括新作物种类添加、新作物种类组合,间作、轮作、套作的田间排布方式(宽度、行数、行距、带宽、间距和株距等)和种植时间组合等,以提高间作优势^[119,120]。除传统的禾本科粮食作物与豆科组合外,茶树和部分药用植物也可与豆科牧草间作和套作,其既能提升茶叶和药材产量,也能提升品质^[121]。轮作应根据前茬后茬植物的差异互补性和双向化感作用,因地制宜采用“纯粮”、“粮-经”和“肥-粮-经”等多样化轮作模式,发挥共生固氮豆科植物的功能性,综合评估轮作作物的协同和权衡^[122]。此外,根据植物-土壤反馈原理,也有学者针对优势种的退化草地提出免耕的新方法^[123]。总之,未来要筛选合适的豆科与其他作物类型或者品种组合,以强化作物之间的互补和合作,减少种间竞争作用,实现资源高效利用。

6 小结

生物固氮,尤其根瘤共生固氮,是将空气中的氮带入到人类管理(human-managed)生态系统最重要的方式,它是大自然对人类的无私馈赠。人们要充分利用大好自然之手,把空气中自由的氮气带入到农业及草地等生态系统,例如农业中的禾豆间作、套作、轮作等技术,天然草地豆科牧草补播技术和人工草地多种禾豆混播技术等。这些措施的实施对维护国家粮食安全,有效缓解因滥用氮肥所造成的环境污染和能源浪费具有重要的现实意义。一场美丽的根瘤共生固氮画卷正在徐徐展开,这为科学家探索令人兴奋的生物固氮未知领域提供重要线索和机遇。利用合成生物学技术手段将固氮微生物的固氮基因簇引入到禾本科作物并高效稳定固氮在不远的将来可能变成现实。利用宏基因组技术、单细胞技术以及多组学等技术,充分挖掘高效固氮根瘤菌和放线菌结瘤种质资源。利用系统发育分析方法以及大模型方法,并结合分子生物学技术与化石证据等,对根瘤起源的问题进行深入探索。研究者有理由相信生物固氮理论和实践应用的双重突破能为将来更好的利用根瘤共生固氮和创建绿色可持续发展农业保驾护航。

参考文献

- 1 Chakraborty S, Venkataraman M, Infante V, et al. Scripting a new dialogue between diazotrophs and crops. *Trends Microbiol*, 2024, 32: 577–589
- 2 Ladha J K, Peoples M B, Reddy P M, et al. Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Res*, 2022, 283: 108541
- 3 Xu P, Wang E. Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants. *Curr Biol*, 2023, 33: R543–R559
- 4 Wang J L, Liu C, Lei L. Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria and their nitrogen fixation potential (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2022, 62: 2861–2878 [王加龙, 刘驰, 雷丽, 等. 非共生固氮菌及其固氮作用. *微生物学报*, 2022, 62: 2861–2878]
- 5 Guo K, Yang J, Yu N, et al. Biological nitrogen fixation in cereal crops: progress, strategies, and perspectives. *Plant Commun*, 2023, 4: 100499
- 6 Xu P X, Han L L, He J Z, et al. Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes (in Chinese). *Chin J Appl Ecol*, 2017, 28: 3440–3450 [徐鹏霞, 韩丽丽, 贺纪正, 等. 非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展. *应用生态学报*, 2017, 28: 3440–3450]
- 7 Nishida H, Suzuki T. Nitrate-mediated control of root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 44: 129–136
- 8 Yang J, Liu C W, Li X, et al. Advances in the legume-rhizobia symbiosis (in Chinese). *J Plant Physiol*, 2023, 59: 1407–1435 [杨军, 刘承武, 李霞, 等. 豆科植物-微生物共生固氮研究进展. *植物生理学报*, 2023, 59: 1407–1435]
- 9 Huisman R, Geurts R. A roadmap toward engineered nitrogen-fixing nodule symbiosis. *Plant Commun*, 2020, 1: 100019
- 10 Roy S, Liu W, Nandety R S, et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*,

- 2020, 32: 15–41
- 11 Cheng Q. The Earth Is A Clock: a natural history of biological nitrogen fixation and the planetary future (in Chinese). Beijing: Science Press, 2013 [程奇. 地球是钟(固氮篇). 北京: 科学出版社, 2013]
 - 12 Ardley J, Sprent J. Evolution and biogeography of actinorhizal plants and legumes: a comparison. *J Ecol*, 2021, 109: 1098–1121
 - 13 Chen M Y, Teng W K, Zhao L, et al. Phylogenomics uncovers evolutionary trajectory of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Mol Biol Evol*, 2022, 39: msac171
 - 14 Santi C, Bogusz D, Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot*, 2013, 111: 743–767
 - 15 Sánchez-Baracaldo P, Bianchini G, Wilson J D, et al. Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends Microbiol*, 2022, 30: 143–157
 - 16 Song C J, Ma K M, Fu B J, et al. A review on the functions of nitrogen-fixers in terrestrial ecosystems (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2009, 29: 869–877 [宋成军, 马克明, 傅伯杰, 等. 固氮类植物在陆地生态系统中的作用研究进展. 生态学报, 2009, 29: 869–877]
 - 17 Rousk K. Biotic and abiotic controls of nitrogen fixation in cyanobacteria-moss associations. *New Phytol*, 2022, 235: 1330–1335
 - 18 Vitousek P M, Cassman K, Cleveland C, et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 2002, 57: 1–45
 - 19 Svistoonoff S, Hoher V, Gherbi H. Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation? *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 20: 11–18
 - 20 Tamme R, Pärtel M, Kõljalg U, et al. Global macroecology of nitrogen-fixing plants. *Glob Ecol Biogeogr*, 2021, 30: 514–526
 - 21 Yao Y, Han B, Dong X, et al. Disentangling the variability of symbiotic nitrogen fixation rate and the controlling factors. *Glob Change Biol*, 2024, 30: e17206
 - 22 Mathesius U. Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. *J Plant Physiol*, 2022, 276: 153765
 - 23 dos Santos D, Joner F, Shipley B, et al. Crop functional diversity drives multiple ecosystem functions during early agroforestry succession. *J Appl Ecol*, 2021, 58: 1718–1727
 - 24 Guinet M, Nicolardot B, Voisin A S. Provision of contrasted nitrogen-related ecosystem services among grain legumes. *Agron Sustain Dev*, 2020, 40: 33
 - 25 Wang E T. Plant-rhizobium symbiosis (in Chinese). *China Basic Sci*, 2016, 18: 21–27 [王二涛. 植物-根瘤菌共生固氮. 中国基础科学, 2016, 18: 21–27]
 - 26 James E K. The seeds of nodulation. *J Plant Physiol*, 2022, 278: 153812
 - 27 Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 2008, 311: 1–18
 - 28 Liang H, Zhou G P, Gao S J, et al. Exploring site-specific N application rate to reduce N footprint and increase crop production for green manure-rice rotation system in southern China. *J Environ Manage*, 2023, 347: 119033
 - 29 Zhao J, Chen J, Beillouin D, et al. Global systematic review with meta-analysis reveals yield advantage of legume-based rotations and its drivers. *Nat Commun*, 2022, 13: 4926
 - 30 Gu C, Huang W, Li Y, et al. Green manure amendment can reduce nitrogen fertilizer application rates for oilseed rape in maize-oilseed rape rotation. *Plants*, 2021, 10: 2640
 - 31 Cai Y, Hao M D. Effects of rotation model and period on wheat yield, nutrient uptake and soil fertility in the Loess Plateau (in Chinese). *J Plant Nutr Fert*, 2015, 21: 864–872 [蔡艳, 郝明德. 轮作模式与周期对黄土高原旱地小麦产量、养分吸收和土壤肥力的影响. 植物营养与肥科学报, 2015, 21: 864–872]
 - 32 Li X F, Wang Z G, Bao X G, et al. Long-term increased grain yield and soil fertility from intercropping. *Nat Sustain*, 2021, 4: 943–950
 - 33 Wang X, Gao Y, Zhang H, et al. Enhancement of rhizosphere citric acid and decrease of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio by root interactions facilitate N fixation and transfer. *Plant Soil*, 2020, 447: 169–182
 - 34 Wang X, Gao Y. Advances in the mechanism of cereal/legume intercropping promotion of symbiotic nitrogen fixation (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2020, 65: 142–149 [王新宇, 高英志. 禾本科/豆科间作促进豆科共生固氮机理研究进展. 科学通报, 2020, 65: 142–149]
 - 35 Hu B, Flemetakis E, Liu Z, et al. Significance of nitrogen-fixing actinorhizal symbioses for restoration of depleted, degraded, and contaminated soil. *Trends Plant Sci*, 2023, 28: 752–764
 - 36 Zhao Y Z, Wang H M, Wang Z Q. The role of leguminous plants and rhizobium in ecological environment (in Chinese). *Agro Environ Dev*,

- 2013, 30: 7–12 [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. 农业环境与发展, 2013, 30: 7–12]
- 37 Mosley O E, Gios E, Close M, et al. Nitrogen cycling and microbial cooperation in the terrestrial subsurface. *ISME J*, 2022, 16: 2561–2573
- 38 Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 263–276
- 39 Humphreys J, Lan R, Tao S. Development and recent progress on ammonia synthesis catalysts for Haber-Bosch process. *Adv Energy Mater*, 2021, 2: 2000043
- 40 Stokstad E. The nitrogen fix. *Science*, 2016, 353: 1225–1227
- 41 Hayashi K. Nitrogen cycling and management focusing on the central role of soils: a review. *Soil Sci Plant Nutr*, 2022, 68: 514–525
- 42 Fowler D, Coyle M, Skiba U, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368: 20130164
- 43 Davies-Barnard T, Friedlingstein P. The global distribution of biological nitrogen fixation in terrestrial natural ecosystems. *Glob Biogeochem Cycle*, 2020, 34: e2019GB006387
- 44 Zhang L, Wang X, Wang J, et al. Alpine meadow degradation depresses soil nitrogen fixation by regulating plant functional groups and diazotrophic community composition. *Plant Soil*, 2022, 473: 319–335
- 45 Vitousek P M, Menge D N L, Reed S C, et al. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368: 20130119
- 46 Unkovich M, Herridge D, Peoples M, et al. Measuring plants-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *ACIAR*, 2008, 136: 258
- 47 Ladha J K, Tirol-Padre A, Reddy C K, et al. Global nitrogen budgets in cereals: a 50-year assessment for maize, rice and wheat production systems. *Sci Rep*, 2016, 6: 19355
- 48 Kebede E. Contribution, utilization, and improvement of legumes-driven biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Front Sustain Food Syst*, 2021, 5: 767998
- 49 Kou-Giesbrecht S, Menge D. Nitrogen-fixing trees could exacerbate climate change under elevated nitrogen deposition. *Nat Commun*, 2019, 10: 1493
- 50 Libourel C, Keller J, Brichet L, et al. Comparative phylotranscriptomics reveals ancestral and derived root nodule symbiosis programmes. *Nat Plants*, 2023, 9: 1067–1080
- 51 Griesmann M, Chang Y, Liu X, et al. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science*, 2018, 361: eaat1743
- 52 Zhang Y, Fu Y, Xian W, et al. Comparative phylogenomics and phylotranscriptomics provide insights into the genetic complexity of nitrogen-fixing root-nodule symbiosis. *Plant Commun*, 2024, 5: 100671
- 53 Delaux P M, Radhakrishnan G, Oldroyd G. Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 26: 95–99
- 54 Kipp M A, Stüeken E E, Strömberg C A E, et al. Nitrogen isotopes reveal independent origins of N_2 -fixing symbiosis in extant cycad lineages. *Nat Ecol Evol*, 2024, 8: 57–69
- 55 Sprent J I, Ardley J, James E K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol*, 2017, 215: 40–56
- 56 Doyle J J. Chasing unicorns: nodulation origins and the paradox of novelty. *Am J Bot*, 2016, 103: 1865–1868
- 57 Soltis D E, Soltis P S, Morgan D R, et al. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2647–2651
- 58 van Velzen R, Holmer R, Bu F, et al. Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E4700–E4709
- 59 Zhang R, Wang Y H, Jin J J, et al. Exploration of plastid phylogenomic conflict yields new insights into the deep relationships of Leguminosae. *Syst Biol*, 2020, 69: 613–622
- 60 Behm J E, Geurts R, Kiers E T. *Parasponia*: a novel system for studying mutualism stability. *Trends Plant Sci*, 2014, 19: 757–763
- 61 van Velzen R, Doyle J J, Geurts R. A resurrected scenario: single gain and massive loss of nitrogen-fixing nodulation. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 49–57
- 62 Li H T, Luo Y, Gan L, et al. Plastid phylogenomic insights into relationships of all flowering plant families. *BMC Biol*, 2021, 19: 232
- 63 Downie J A. Legume nodulation. *Curr Biol*, 2014, 24: 184–190
- 64 Luo Z, Liu H, Xie F. Cellular and molecular basis of symbiotic nodule development. *Curr Opin Plant Biol*, 2023, 76: 102478

- 65 Ye Q, Zhu F, Sun F, et al. Differentiation trajectories and biofunctions of symbiotic and un-symbiotic fate cells in root nodules of *Medicago truncatula*. *Mol Plant*, 2022, 15: 1852–1867
- 66 Liu S B, Ratet P, Magne K. Nodule diversity, evolution, organogenesis and identity. *Adv Bot Res*, 2020, 94: 119–148
- 67 Zhao Y, Zhang R, Jiang K W, et al. Nuclear phylotranscriptomics and phylogenomics support numerous polyploidization events and hypotheses for the evolution of rhizobial nitrogen-fixing symbiosis in Fabaceae. *Mol Plant*, 2021, 14: 748–773
- 68 Mergaert P, Kereszt A, Kondorosi E. Gene expression in nitrogen-fixing symbiotic nodule cells in *Medicago truncatula* and other nodulating plants. *Plant Cell*, 2020, 32: 42–68
- 69 Wang D, Dong W, Murray J, et al. Innovation and appropriation in mycorrhizal and rhizobial Symbioses. *Plant Cell*, 2022, 34: 1573–1599
- 70 Wang C, Li M, Zhao Y, et al. SHORT-ROOT paralogs mediate feedforward regulation of D-type cyclin to promote nodule formation in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2108641119
- 71 Dong W, Zhu Y, Chang H, et al. An SHR-SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation. *Nature*, 2021, 589: 586–590
- 72 Feng J, Lee T, Schiessl K, et al. Processing of NODULE INCEPTION controls the transition to nitrogen fixation in root nodules. *Science*, 2021, 374: 629–632
- 73 Soyano T, Shimoda Y, Kawaguchi M, et al. A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in *Lotus*. *Science*, 2019, 366: 1021–1023
- 74 Schiessl K, Lilley J L S, Lee T, et al. NODULE INCEPTION recruits the lateral root developmental program for symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr Biol*, 2019, 29: 3657–3668.e5
- 75 Lee T, Orvosova M, Batzenschlager M, et al. Light-sensitive short hypocotyl genes confer symbiotic nodule identity in the legume *Medicago truncatula*. *Curr Biol*, 2024, 34: 825–840.e7
- 76 Taylor B N, Menge D N L. Light regulates tropical symbiotic nitrogen fixation more strongly than soil nitrogen. *Nat Plants*, 2018, 4: 655–661
- 77 Zhang C C, Zhou C Z, Burnap R L, et al. Carbon/nitrogen metabolic balance: lessons from cyanobacteria. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 1116–1130
- 78 Wang T, Guo J, Peng Y, et al. Light-induced mobile factors from shoots regulate rhizobium-triggered soybean root nodulation. *Science*, 2021, 374: 65–71
- 79 Chen J, Xu H, Liu Q, et al. Shoot-to-root communication via GmUVR8-GmSTF3 photosignaling and flavonoid biosynthesis fine-tunes soybean nodulation under UV-B light. *New Phytol*, 2024, 241: 209–226
- 80 Ji H, Xiao R, Lyu X, et al. Differential light-dependent regulation of soybean nodulation by papilionoid-specific HY5 homologs. *Curr Biol*, 2022, 32: 783–795.e5
- 81 Ke X, Xiao H, Peng Y, et al. Phosphoenolpyruvate reallocation links nitrogen fixation rates to root nodule energy state. *Science*, 2022, 378: 971–977
- 82 Liu Z, Yang J, Long Y, et al. Single-nucleus transcriptomes reveal spatiotemporal symbiotic perception and early response in *Medicago*. *Nat Plants*, 2023, 9: 1734–1748
- 83 Frank M, Fechete L I, Tedeschi F, et al. Single-cell analysis identifies genes facilitating rhizobium infection in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*, 2023, 14: 7171
- 84 Sun Z, Jiang S, Wang D, et al. Single-cell RNA-seq of *Lotus japonicus* provide insights into identification and function of root cell types of legume. *JIPB*, 2023, 65: 1147–1152
- 85 Sun B, Wang Y, Yang Q, et al. A high-resolution transcriptomic atlas depicting nitrogen fixation and nodule development in soybean. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65: 1536–1552
- 86 Liu Z, Kong X, Long Y, et al. Integrated single-nucleus and spatial transcriptomics captures transitional states in soybean nodule maturation. *Nat Plants*, 2023, 9: 515–524
- 87 Wu Z, Chen H, Pan Y, et al. Genome of *Hippophae rhamnoides* provides insights into a conserved molecular mechanism in actinorhizal and rhizobial symbioses. *New Phytol*, 2022, 235: 276–291
- 88 Soper F M, Boutton T W, Sparks J P. Investigating patterns of symbiotic nitrogen fixation during vegetation change from grassland to woodland using fine scale $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 89–100
- 89 Zhang H, Plett J M, Catunda K L M et al. Rapid quantification of biological nitrogen fixation using optical spectroscopy. *J Exp Bot*, 2024, 75:

760–771

- 90 Yao Q H, Peng R H, Tian Y S, et al. Endowing plants with the capacity for autogenic nitrogen fixation. *Res Square*, 2021, doi: 10.21203/rs.3.rs-436726/v1
- 91 Bellenger J P, Darnajoux R, Zhang X, et al. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. *Biogeochemistry*, 2020, 149: 53–73
- 92 Mommer L, Kirkegaard J, van Ruijven J. Root-root interactions: towards a rhizosphere framework. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 209–217
- 93 Venturi V, Keel C. Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 187–198
- 94 Djighaly P I, Diagne N, Ngom D, et al. Effect of symbiotic associations with *Frankia* and arbuscular mycorrhizal fungi on antioxidant activity and cell ultrastructure in *C. equisetifolia* and *C. obesa* under salt stress. *J For Res*, 2022, 27: 117–127
- 95 Zheng M, Zhou Z, Zhao P, et al. Effects of human disturbance activities and environmental change factors on terrestrial nitrogen fixation. *Glob Change Biol*, 2020, 26: 6203–6217
- 96 Yu H, Liu X, Yang C, et al. Co-symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and diazotrophs promote biological nitrogen fixation in mangrove ecosystems. *Soil Biol Biochem*, 2021, 161: 108382
- 97 Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T, et al. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *J Plant Res*, 2019, 132: 541–568
- 98 Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 636–641
- 99 Duan H X, Shi Q, Kang S P, et al. Advances in research on the interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, and plants (in Chinese). *Acta Pratacul Sin*, 2024, 33: 166–182 [段海霞, 师茜, 康生萍, 等. 丛枝菌根真菌和根瘤菌与植物共生研究进展. 草业学报, 2024, 33: 166–182]
- 100 Tsikou D, Nikolaou C N, Tsiknia M, et al. Interplay between rhizobial nodulation and arbuscular mycorrhizal fungal colonization in *Lotus japonicus* roots. *J Appl Microbiol*, 2023, 134: 1xac010
- 101 Zhang H, Wang X, Gao Y, et al. Short-term N transfer from alfalfa to maize is dependent more on arbuscular mycorrhizal fungi than root exudates in N deficient soil. *Plant Soil*, 2020, 446: 23–41
- 102 Dong W, Song Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5926
- 103 Dagan R, Dovrat G, Masci T, et al. Competition-induced downregulation of symbiotic nitrogen fixation. *New Phytol*, 2023, 240: 2288–2297
- 104 Chamkhi I, Cheto S, Geistlinger J, et al. Legume-based intercropping systems promote beneficial rhizobacterial community and crop yield under stressing conditions. *Industrial Crops Products*, 2022, 183: 114958
- 105 Hu H Y, Li H, Hao M M, et al. Nitrogen fixation and crop productivity enhancements co-driven by intercrop root exudates and key rhizosphere bacteria. *J Appl Ecol*, 2021, 58: 2243–2255
- 106 Zheng M, Zhou Z, Luo Y, et al. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: a meta-analysis. *Glob Change Biol*, 2019, 25: 3018–3030
- 107 Li B, Li Y Y, Wu H M, et al. Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N₂ fixation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 6496–6501
- 108 Dang K, Gong X, Zhao G, et al. Intercropping alters the soil microbial diversity and community to facilitate nitrogen assimilation: a potential mechanism for increasing proso millet grain yield. *Front Microbiol*, 2020, 11: 601054
- 109 Guo Q, Yan L, Korpelainen H, et al. Plant-plant interactions and N fertilization shape soil bacterial and fungal communities. *Soil Biol Biochem*, 2019, 128: 127–138
- 110 Han Q, Ma Q, Chen Y, et al. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *ISME J*, 2020, 14: 1915–1928
- 111 Chen W X, Wang E T. Rhizobia in China (in Chinese). Beijing: Science Press, 2011 [陈文新, 汪恩涛. 中国根瘤菌. 北京: 科学出版社, 2011]
- 112 Gupta V V S R, Roley S S. Nitrogen: non-symbiotic nitrogen fixation in soils. In Scott A. Elias ed. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Amsterdam: Elsevier, 2023
- 113 Hu W, Wang X, Xu Y, et al. Biological nitrogen fixation and the role of soil diazotroph niche breadth in representative terrestrial ecosystems. *Soil Biol Biochem*, 2024, 189: 109261

- 114 Tognetti P M, Prober S M, Báez S, et al. Negative effects of nitrogen override positive effects of phosphorus on grassland legumes worldwide. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2021, 118: e2023718118
- 115 Schleuss P M, Widdig M, Heintz-Buschart A, et al. Interactions of nitrogen and phosphorus cycling promote P acquisition and explain synergistic plant-growth responses. [Ecology](#), 2020, 101: e03003
- 116 Zhong Y, Tian J, Li X, et al. Cooperative interactions between nitrogen fixation and phosphorus nutrition in legumes. [New Phytol](#), 2023, 237: 734–745
- 117 Li M, Zhang P, Guo Z, et al. Molybdenum nanofertilizer boosts biological nitrogen fixation and yield of soybean through delaying nodule senescence and nutrition enhancement. [ACS Nano](#), 2023, 17: 14761–14774
- 118 Cao X, Yue L, Wang C, et al. Foliar application with iron oxide nanomaterials stimulate nitrogen fixation, yield, and nutritional quality of soybean. [ACS Nano](#), 2022, 16: 1170–1181
- 119 Yang S, Zhao Y, Xu Y, et al. Yield performance response to field configuration of maize and soybean intercropping in China: a meta-analysis. [Field Crops Res](#), 2024, 306: 109235
- 120 Qiao M, Sun R, Wang Z, et al. Legume rhizodeposition promotes nitrogen fixation by soil microbiota under crop diversification. [Nat Commun](#), 2024, 15: 2924
- 121 Duan Y, Wang T, Zhang P, et al. The effect of intercropping leguminous green manure on theanine accumulation in the tea plant: a metagenomic analysis. [Plant Cell Environ](#), 2024, 47: 1141–1159
- 122 Yang X, Xiong J, Du T, et al. Diversifying crop rotation increases food production, reduces net greenhouse gas emissions and improves soil health. [Nat Commun](#), 2024, 15: 198
- 123 Guo M Q, Liu L, Jing J Y, et al. Species selection for no-tillage reseeding in grassland restoration based on plant-soil feedback. *Acta Pratacul Sin*, 2023, 32:14–23 [郭美琪, 刘琳, 荆晶莹, 等. 基于植物-土壤反馈原理的退化草原免耕补播修复物种选择研究. *草业学报*, 2023, 32: 14–23]

Advances and prospects in plant root nodule symbiotic nitrogen fixation

GAO YingZhi^{1,2*} & REN Jian¹

¹ Key Laboratory of Vegetation Ecology of the Ministry of Education, State Environmental Protection Key Laboratory of Wetland Ecology and Vegetation Restoration, Jilin Songnen Grassland Ecosystem National Observation and Research Station, Institute of Grassland Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China

² Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology of Western Arid Desert Area of the Ministry of Education, College of Grassland Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

* Corresponding author; E-mail: gaoyz108@nenu.edu.cn

Symbiotic nitrogen fixation in plant root nodules refers to the formation of nitrogen-fixing “organs”, root nodules, during the symbiotic process between a host plant and diazotrophic microorganisms. This includes symbiosis between legumes and rhizobia and between actinorhizal plants and *Frankia*. Annually, approximately 2.59×10^7 tons of nitrogen are fixed by root-nodule symbioses, accounting for approximately 29.4% of the total biologically fixed nitrogen in terrestrial ecosystems. Root-nodule symbiosis between legumes and rhizobia is one of the most efficient biological nitrogen fixation systems and has significant ecological and economic value. Root nodules exhibit complex phylogenetic and developmental characteristics. This complexity is apparent not only in the exclusive presence of root nodules in the “nitrogen-fixing nodulation clade” distributed among the orders Fabales, Cucurbitales, Fagales, and Rosales but also in the structural differences of root nodules between legumes and actinorhizal plants, ultimately influencing the evolutionary paths of different nodule lineages. Recent progress in root nodule symbiotic nitrogen fixation has led to outstanding achievements in the evolution of symbiotic nitrogen fixation, genetics and developmental biology, light environmental regulation, and carbon energy factor regulation that underpin it. Future research should focus on the mechanisms of actinorhizal plant root nodule symbiosis, the eco-geography of symbiotic nitrogen fixation, the underlying mechanisms of the interaction between the symbiotic nitrogen-fixing microbes and plants, and relative studies should evaluate gene editing and synthetic biology. These studies aim to utilize root-nodule symbiosis in the future and provide both practical and theoretical foundations for creating greener, sustainable agricultural development.

rhizobia, *Frankia*, root nodule symbiotic nitrogen fixation, nitrogen-fixing nodulation clade, phylogenetic evolution

doi: [10.1360/SSV-2024-0014](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0014)