

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-081

固氮合成生物学研究进展

李超, 张焕, 杨军, 王二涛

(中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 自然界中, 豆科植物可以通过与根瘤菌的共生, 利用其固氮能力将空气中的氮气 (N_2) 还原为植物可直接利用的氨 (NH_3), 从而降低了豆科植物对化学氮肥的需求。然而, 玉米和水稻等非豆科作物缺乏根瘤共生固氮的能力, 其高产稳产严重依赖化学氮肥的施用。过量施用氮肥导致土壤板结酸化, 温室气体排放及水体富营养化等严峻的环境问题, 严重威胁农业可持续发展和粮食安全。本文综述了固氮合成生物学的研究历史与现状, 为降低非豆科作物对化学氮肥的依赖, 固氮合成生物学提出了多种策略: 改造根际固氮菌以增强对宿主的氮素供给; 增强作物根际招募有益固氮微生物的能力以提高氮素利用效率; 工程化改造非豆科植物形成类根瘤器官实现共生固氮; 或将固氮酶系统直接导入植物细胞以创制自主固氮作物。近年来, 该领域在提升作物产量和部分替代化学氮肥方面已取得显著进展, 推动了生物固氮技术在可持续农业与生态环境保护中的创新应用。本文最后对固氮合成生物学的未来发展方向进行了展望, 旨在为相关研究提供理论参考与技术指导。

关键词: 生物固氮; 合成生物学; 固氮酶; 非豆科作物; 自主固氮作物

中图分类号: Q945.13; Q81 **文献标志码:** A

Research advances in nitrogen fixation synthetic biology

LI Chao, ZHANG Huan, YANG Jun, WANG Ertao

(National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Nitrogen is an essential element for plant growth and development. Legume plants form symbiotic relationships with rhizobia, which facilitates the biological fixation of atmospheric nitrogen (N_2) into ammonia (NH_3) that is directly usable by the plants through the action of rhizobial nitrogenase. This process reduces the need for chemical nitrogen fertilizers. However, under the pressure of continuously increasing food demand driven by a growing global population, the major non-leguminous food crops for humans, such as maize, rice and wheat, lack the ability to form nodules and establish symbiosis with rhizobia. This results in a heavy dependence on chemical nitrogen fertilizer to maintain high and stable yields. However, the overuse of chemical nitrogen fertilizers has caused serious environmental problems, including soil compaction and acidification, greenhouse gas emissions, and water

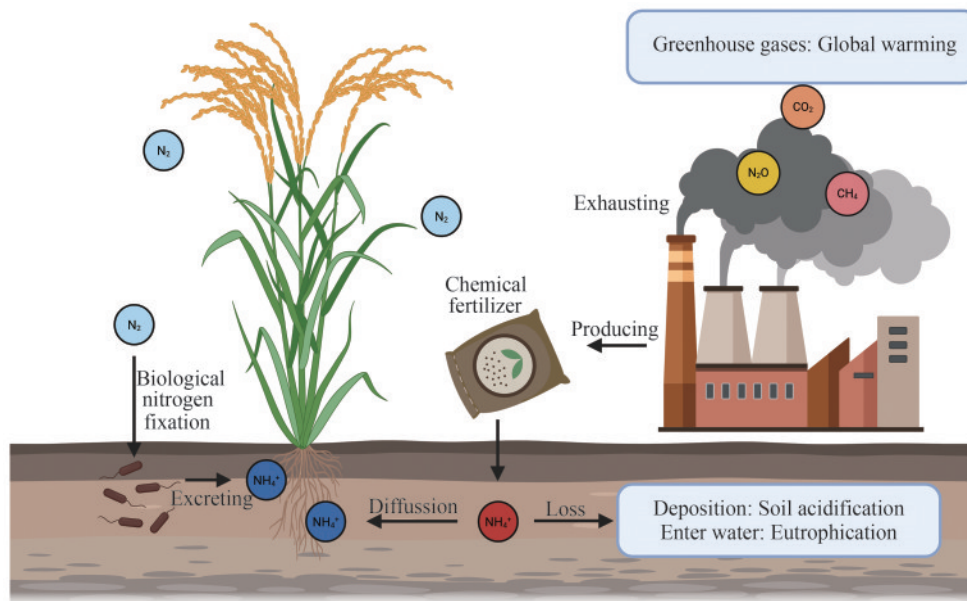
收稿日期: 2025-08-01 修回日期: 2025-09-10

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB1240000)

引用本文: 李超, 张焕, 杨军, 王二涛. 固氮合成生物学研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1041-1057

Citation: LI Chao, ZHANG Huan, YANG Jun, WANG Ertao. Research advances in nitrogen fixation synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1041-1057

eutrophication, all of which threaten agricultural sustainability and global food security. To achieve green and sustainable agricultural development and reduce the use of chemical fertilizers, nitrogen-fixing synthetic biology utilizes tools of synthetic biology to modify, optimize, and even *de novo* design biological nitrogen fixation systems. These engineered systems are applied across agricultural production, environmental protection, and industrial biotechnology, addressing global challenges such as excessive dependence on chemical nitrogen fertilizers, high energy consumption, and environmental pollution. The innovative strategies for bioengineering biological nitrogen fixation in non-leguminous crops can be categorized into the following four aspects. These strategies include engineering rhizobial nitrogen-fixing bacteria to increase nitrogen supply to the host, engineering crops to enhance the ability of plants to recruit nitrogen-fixing microbes in the rhizosphere to improve nitrogen use efficiency, forming nodule-like structures for symbiotic nitrogen fixation, and transferring functional nitrogenase components into plant cells to create self-fertilizing crops. Significant advances have been achieved in all these approaches in recent years, demonstrating their potential to boost yields while reducing fertilizers. This review provides a comprehensive overview of recent breakthroughs in nitrogen-fixing synthetic biology. We also discuss the current challenges and future prospects, offering theoretical insights and technical guidance to support further research and the practical application of biological nitrogen fixation in sustainable agriculture and environmental protection.



Keywords: biological nitrogen fixation; synthetic biology; nitrogenase; non-leguminous crops; self-fertilizing crops

氮是植物生长发育必需的营养成分，尽管氮在大气中含量丰富，但大多数植物无法直接利用空气中的氮气，其生长发育受到氮素供应的限制。20世纪初，Fritz Haber和Carl Bosch发明了哈伯-博施法，该方法在催化剂存在的时候，利用高温高压可以直接将氮气和氢气合成植物可利用的氨，化学氮肥的使用显著提高了农业生产力，满足了

世界上近一半人口的粮食需求^[1-2]。随着人口的持续增长，农业生产已严重依赖化学氮肥才能满足全球日益增长的粮食需求^[3]。然而，化学氮肥的不合理施用导致了土壤板结、酸化等严重的环境问题，威胁到农业的可持续发展和粮食安全^[4-5]。自然界中，豆科植物可以通过与根瘤菌共生将空气中的氮气（N₂）还原为植物可直接利用的氨

(NH_3)，显著降低豆科植物在生产中对化学氮肥的依赖^[6]。利用生物固氮替代化学氮肥，是实现作物绿色安全生产、推动农业可持续发展的重要方法。同时，固氮合成生物学的发展也为构建高效生物固氮系统带来了新的机遇。

1 生物固氮作用

根际微生物被称为植物的“第二基因组”，它们可以通过改善根际营养状况促进植物的生长发育。其中，根际固氮菌通过生物固氮作用为植物提供氮源^[7]。生物固氮作用是固氮微生物在厌氧或微氧、常温常压条件下，通过固氮酶催化将空气中 N_2 还原成 NH_4^+ 的过程，它为生态系统提供重要的氮源，是自然界化合态氮形成的主要途径^[8-9]。全球每年生物固氮量为1.75亿吨，土壤中60%的氮素来自生物固氮，由此可见，根际固氮菌在农业可持续发展中具有巨大的应用潜力^[10]。

根据微生物与植物的互利关系以及固氮方式的差异，可以将根际固氮菌分为自生固氮菌、联合固氮菌和共生固氮菌三类^[11]。其中，自生固氮菌和联合固氮菌统称为非共生固氮菌。自生固氮菌在微氧条件下固定 N_2 供自身使用，如发状念珠藻 (*Nostoc flagelliforme*)、棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 等^[12-13]。联合固氮菌则附着于植物根系表面，与植物形成松散联合的固氮体系，部分菌体可侵入植物皮层或维管，利用植物根系分泌物生长，并原位靶向地为植物提供可以直接利用的氮素。每年世界范围内联合固氮细菌的固氮量约为50~70 Tg。在玉米和水稻中，联合固氮菌（如假单胞菌属、类芽孢杆菌属和克雷伯氏菌属）能够满足作物约20%~25%的氮素需求，在部分农田生态系统中甚至可以提供总固氮量的30%~50%^[14-17]。共生固氮菌则与宿主形成互惠互利的共生关系，获取宿主营养物质的同时通过生物固氮作用为宿主提供氮素，例如根瘤菌、弗兰克氏菌和蓝藻等^[12-13]。根瘤菌与豆科植物（如大豆和苜蓿）的共生是研究最为深入的植物-微生物的相互作用^[18-21]。豆科植物通过形成根瘤创造的微氧环境，有助于根瘤中的根瘤菌将空气中的 N_2 还原为 NH_4^+ 供宿主植物生长。根瘤菌-豆科植物共

生的年全球固氮量约为21.5 Tg，能满足作物约30%~83%的氮素需求^[10, 13, 22-23]。利用生物固氮促进作物绿色安全生产，是农业可持续发展最具有潜力的方向。目前，在作物培养中联合固氮菌供给植物氮素的能力较弱，氮固定量不足以完全支持作物的生长发育；可以共生固氮的根瘤菌虽然供给植物氮素的能力强，但仅局限于豆科作物。如何提高非豆科植物生物固氮的能力，完全或部分替代工业氮肥，是一个世界性的农业科技难题。因此，可通过以下工程化策略改造非豆科植物：①改造根际固氮菌增强对宿主的氮素供给；②增强作物根际招募有益固氮微生物的能力，从而提高氮素利用效率；③使非豆科植物形成类根瘤器官以实现共生固氮；④直接将固氮酶导入植物细胞以创制自主固氮作物（图1）。这些策略对推动农业的可持续发展具有重要意义。合成生物学是将现代工程学原理与生物学、物理学、化学及计算机科学相融合的交叉学科，旨在对现有生物系统进行定向的改造或创造具有全新功能的生物系统，使用合成生物学方法提高作物的病害抗性、逆境抗性与生产品质以及增加作物产量方面已被证明是显著有效的^[10, 13, 22-23]。固氮合成生物学融合了合成生物学和生物固氮两大前沿领域，其核心目标是利用合成生物学工具对生物固氮系统进行理解、改造、优化甚至从头设计，将其应用于农业生产、环境保护和工业生物技术等领域，以解决全球面临的氮肥依赖、能源消耗和环境污染等问题^[3, 24-25]。虽然实现自主固氮作物等宏伟目标仍面临艰巨的科学挑战，但在开发新型高效生物肥料方面已经取得显著进展^[26-28]。近年来，固氮合成生物学领域的蓬勃发展，为人工设计高效生物固氮系统奠定了基础。本文就近年来固氮合成生物学的主要研究进展作简要综述，并针对相关问题提出见解与展望。

2 固氮合成生物学研究的历史和现状

固氮菌利用固氮酶复合体将大气中的 N_2 转化成 NH_4^+ ，为生物提供可利用的氮源^[6]。根据金属活性位点的差异，固氮酶主要分为三类：钼铁固氮酶（细菌和古菌中最主要的类型）、钒铁固氮酶和

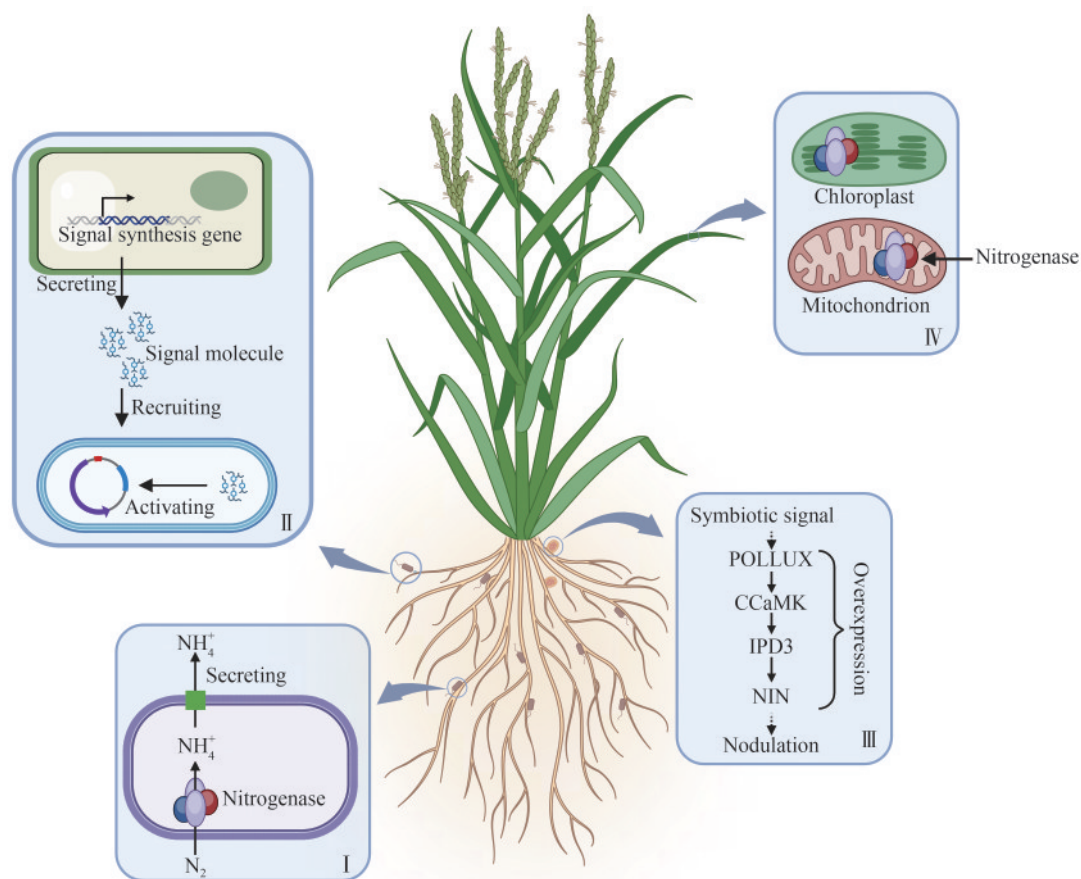


图1 设计或改进生物固氮的策略

(I .改良固氮菌, 增强固氮酶活性, 提高铵的外排效率; II .增强作物根际招募有益固氮菌并调控固氮菌固氮活动的能力;
III .解析结瘤机制, 实现非豆科植物共生固氮; IV .在植物细胞器表达固氮酶, 实现植物自主固氮)

Fig. 1 Main approaches to engineer or improve biological nitrogen fixation

(I .Engineer nitrogen-fixing bacteria to enhance nitrogenase activity and optimize ammonium excretion efficiency; II .Strengthen crops' ability to recruit beneficial diazotrophs in the rhizosphere and regulate their nitrogen-fixing activity; III .Decipher nodulation mechanisms to achieve symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants; IV .Express nitrogenase in plant organelles to enable autonomous nitrogen fixation in crops.)

铁固氮酶^[29-30]。其中, 研究最为深入的钼铁固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白组成, 钼铁蛋白是 *nifD* 和 *nifK* 基因产物形成的异源四聚体, 而铁蛋白则是 *nifH* 基因编码的同源二聚体^[31-33]。1971年, Dixon等^[34]首次将肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的固氮酶相关基因导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 并检测到固氮酶活性, 这标志着固氮合成生物学的开始。随着研究的深入, 许多固氮细菌中参与氮气固定与调控的基因被鉴定, 例如参与铁蛋白和钼铁蛋白生物合成与组装的 *nifE*、*nifN*、*nifX*、*nifB*、*nifQ*、*nifV*、*nifM*、*nifW* 和 *nifZ*, 参与固氮酶相关基因表达调控的 *nifS*、参与微氧环境感知与调控的 *nifL/nifA* 与 *fixL/fixJ* 以及胞内全局氮调节双组分系统 *ntrB/ntrC* 等, 这些基因可作为固氮酶的工

程化改造靶点^[35-41]。2012年, 麻省理工学院 Voigt 团队^[42]开发了一种仅使用合成的、特征明确的编码序列自下而上重建基因簇的方法, 重构了肺炎克氏杆菌的固氮基因簇, 很大程度上解决了天然固氮基因簇由于复杂、冗余和综合的宿主调控而难以进行遗传操作的问题。2018年, 北京大学王忆平团队^[43]创新性地设计了一种“多蛋白组装策略”, 将必需固氮基因选择性组装成5个巨型合成基因 (*synthetic giant gene*), 首次实现了携带这些基因的大肠杆菌可以在以 N_2 为唯一氮源的条件下生长。这些研究表明了合成生物学工具在推动生物固氮工程化应用方面的巨大潜力。目前, 该领域在增强根际固氮菌的定植与供氮能力方面已取得显著成效, 但在突破共生固氮菌的宿主专一性

以及在禾谷类作物中合成功能性固氮细胞器等方面的进展较少。

2.1 改造固氮菌实现固氮泌铵能力的增加

定植于植物根系的非共生固氮菌中，大多数固定的氮素用于支持细菌自身生长，而不是释放到根际供给植物利用，因此，增加非共生固氮菌氮素的释放能力是生物固氮研究领域的重要科学问题。在固氮菌中， N_2 被固氮酶还原为可被利用的 NH_4^+ ，游离的 NH_4^+ 与谷氨酸被谷氨酰胺合成酶催化生成氮代谢调控分子谷氨酰胺，固氮菌中的氮代谢调控分子感知到高浓度的抑制固氮酶的表达与活性进而避免能量的浪费（图2）^[14, 44-45]。因此，破坏以谷氨酰胺为代谢传感器的氮代谢调控通路，将生物固氮与铵同化解耦，是在各种固氮菌中增强铵外泌能力的一种通用策略^[46-47]。细菌中，谷氨酰胺合成酶（GS）的活性受腺苷酰转移酶（GlnE）可逆的腺苷酰化修饰调节，GS腺苷酰化后失活，GlnE的可逆腺苷酰化修饰受到响应细胞内氮状态的调控蛋白P II（GlnB）和PZ（GlnZ）的调

控^[48-50]。P II和PZ通过与组氨酸激酶NtrB相互作用，调控应答调控蛋白NtrC的磷酸化状态及其活性，磷酸化的NtrC作为核心转录激活因子，直接调控包括*glnA*（谷氨酰胺合成酶编码基因）和*nifA*（固氮全局转录调控因子NifA编码基因）在内的众多基因，NifA激活固氮酶复合体结构基因*nifHDK*及众多附属*nif*基因的转录^[51-52]。此外，P II和PZ通过与铵转运蛋白AmtB和固氮酶ADP核糖基水解酶（DraG）互作，参与调控固氮酶的ADP-核糖基化修饰、铵离子感应及潜在转运过程^[53-55]。DraG与固氮酶ADP核糖基转移酶（DraT）功能拮抗，DraT通过催化NifH的ADP-核糖基化使其失活，而DraG可逆转该修饰。P II和PZ的活性在一定程度上受其尿苷酰化状态动态调节，双功能酶GlnD响应胞内氮/碳/能量水平调控P II和PZ的尿苷酰化/去尿苷酰化，氮饥饿条件下P II和PZ被GlnD尿苷酰化^[56]。相关研究表明，*A. vinelandii*的*glnA*突变体和茎瘤固氮根瘤菌（*Azorhizobium caulinodans*）的*glnB*或*glnK*（编码氮代谢调控蛋白）突变体中，GS活性降低导致铵的释放^[57-58]。GS的活性同时受

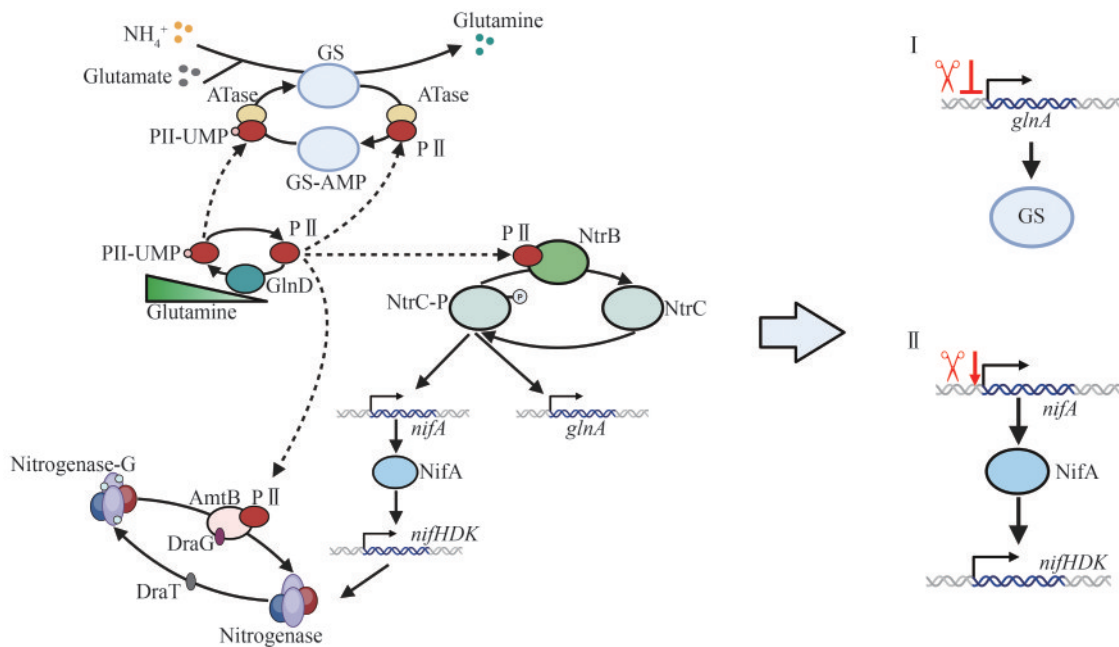


图2 固氮菌中以谷氨酰胺为核心的氮代谢调控通路与增强其固氮能力的策略

(I 删除或调控 *glnA* 基因，使游离的 NH_4^+ 被释放； II 调控 *nifA* 的表达，增强 NifA 对固氮基因簇的激活，增加固氮酶活性)

Fig. 2 The glutamine-core nitrogen metabolism regulatory pathway in diazotrophs and strategies for enhancing nitrogen fixation capacity

(I Delete or regulate the *glnA* gene to release free NH_4^+ ; II Modulate the expression of NifA to enhance its activation of the nitrogenase gene cluster, thereby increasing nitrogenase activity.)

到单向腺苷酸转移酶 (uATs) 的抑制, 在巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 和茎瘤固氮根瘤菌 ORS571 (*Azorhizobium caulinodans* ORS571) 中增加单向腺苷酸转移酶的表达, 增强了它们的铵外泌能力^[59-61]。林敏团队^[62]的研究表明, 删除施氏假单胞菌 A1501 (*Pseudomonas stutzeri* A1501) 中铵转运蛋白 AmtB 将导致铵外泌增加。固氮菌中, 在高浓度 NH_4^+ 条件下, 负调控蛋白 NifL 激活后抑制转录因子 NifA 的表达, 进而阻遏固氮酶的活性, 删除 *A. vinelandii* 和 *P. stutzeri* A1501 中的 *nifL* 基因会改善菌株的铵外泌能力, 增强菌株在有氧条件下 *nif* 基因的表达^[62-64]。陈三凤团队^[65]于 2022 年发表的工作中, 揭示了固氮类芽孢杆菌 (*Paenibacillus sabiniae*) T27 通过丙氨酸脱氢酶合成丙氨酸抑制谷氨酰胺合成酶活性, 降低细胞内谷氨酰胺水平, 进而调控固氮基因表达的新机制, 为解决高浓度 NH_4^+ 抑制生物固氮的难题提供了新思路。上述的研究聚焦于固氮菌铵耐受和铵外泌能力的增强, 为非共生固氮菌的工程应用提供了理论基础与技术支持。然而, 固氮菌的生物固氮是极为耗能的过程, 在足够铵外泌的基础上进行生物固氮与铵外泌活动的精细化调控, 有助于实现固氮菌的碳-氮平衡与能量的高效利用。2017 年, Rafael Ambrosio 等^[57]通过外源启动子调控 *A. vinelandii* 中 *glnA* 的表达, 在促进植物的生长的同时实现了 *A. vinelandii* 可控的铵排泄。最新的研究中, 王忆平团队^[66]将基因 *glnA* 的第 95 号氨基酸位点由脯氨酸突变为亮氨酸后, 使得胞内谷氨酰胺的合成表现为温度敏感型, 最终导致氮调控的基因和固氮酶也表达为温度敏感型, 开发出温度介导的铵排泄控制系统。这种温度介导的铵分泌开关机制使固氮菌在为宿主提供氮素的条件下满足了自身生物量增长的需求, 较恒定的铵排泄工程改造有更高的促生效率, 为进一步改善植物共生固氮提供了思路。

2.2 改造固氮菌实现结瘤/定植能力的增加

根际固氮菌能为作物提供一定量的化合态氮, 但其固氮量尚不足以完全满足谷类作物的生长发育需求。通过合成生物技术改善固氮菌与作物之

间的互作关系, 并利用可调控的表达系统调节相关基因的表达, 对于维持固氮工程菌和作物间的共生稳态至关重要^[67-68]。基于植物根系分泌物设计诱导型基因回路, 可确保工程菌仅在根际激活固氮功能, 避免代谢资源浪费。植物-微生物信号传导回路已被成功设计到烟草植株中, 使其具备合成细菌酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 的能力。这些 AHL 能够激活细菌 AHL 生物传感器的基因表达, 并分别恢复了 AHL 合成酶缺陷型金黄假单胞菌 (*Pseudomonas aureofaciens*) 和胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Pectobacterium carotovorum*) 突变体的生物防治活性与致病性^[69]。根瘤菌素 *scyllo*-inosamine (SIA) 和 3-*O*-methyl-*scyllo*-inosamine (3-*O*-MSI), 在豆科共生系统中由根瘤菌合成并可被菌株利用, 根瘤菌素合成基因 *mosABC* 受到 *nifA* 的调控^[70-71]。SIA 和 3-*O*-MSI 在大多数植物根际中不存在, 但相关研究表明, 转入根瘤菌素合成基因的植物可以合成并分泌 SIA, 在根际环境中可显著增强携带根瘤菌素分解代谢基因 (*mosCABRDEF*) 的根瘤菌的定植竞争力^[70-74]。2019 年, Geddes 等^[75]将豆科根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 来源的 *idhA* (编码肌醇脱氢酶) 和苜蓿根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 来源的 *mosB* (编码 L-谷氨酸转氨酶) 转入苜蓿和大麦中, 首次建立了产生 SIA 的工程植物。基于此, Haskett 等^[76]于 2022 年培育出稳定分泌根瘤菌素的纯合大麦品系 (RhiP), 开发了一个混合根瘤菌素吸收系统, 该系统使 *A. caulinodans* ORS571 对根瘤菌素的感知敏感度提高了 1000 倍。通过整合上述系统, 他们成功构建了根瘤菌素依赖型 *nifA-rpoN* 固氮调控回路, 实现工程菌在转基因大麦根部的原位定植与固氮^[76]。这项研究表明, 通过合成生物学驱动细菌-植物相互作用, 可显著增强非豆科作物内生菌或自由生活固氮菌的共生固氮作用, 以满足谷类作物的氮需求。

2.3 解析根瘤共生机制, 实现非豆科作物共生固氮

豆科植物与根瘤菌共生的分子机制已得到较为充分的解析^[77-78]。低氮条件下豆科植物根系分泌的黄酮类化合物招募根瘤菌并诱导其合成结瘤因子 (Nod factor, NF)^[79], NF 激活豆科植物的受

体复合物，如苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中的结瘤因子受体 (MtNFP) 和 LysM 类受体激酶 3 (MtLYK3) 复合物以及日本百脉根 (*Lotus japonicus*) 中的结瘤因子受体 1 (LjNFR1) 和结瘤因子受体 5 (LjNFR5) 复合物，进而激活根瘤共生和菌根共生通用的共生信号通路 (common symbiosis signaling pathway, CSSP) [80-83]，随后，该信号被传递到细胞核引发钙振荡 [84-85]。在细胞核中，钙信号由钙调蛋白依赖性蛋白激酶 MtDMI3/LjCCaMK 解码并磷酸化蛋白 MtIPD3/LjCYCLOPS，磷酸化的转录调控因子 IPD3 与 DELLA 蛋白互作激活下游核心转录调节因子的表达，从而导致根瘤共生或丛枝菌根共生 [86-91]。虽然根瘤共生仅存在于豆科植物，但地球上 90% 的陆地植物都可以与菌根真菌形成共生 [92-95]。因此，可以利用 CSSP，把菌根共生途径与根瘤共生途径相结合，为非豆科植物的根瘤共生改造提供理论基础。

共生固氮起始于宿主对共生信号的感知，OsCERK1 和 OsCEBiP 是水稻中主要的几丁质激酶结合蛋白，当 *L. japonicus* 中 NF 受体 LjNFR1 和 LjNFR5 的胞外结构域被 OsCERK1 和 OsCEBiP 的胞外结构域替换后，几丁质处理可激活共生信号传导 [96]。也有研究表明，介导水稻对丛枝菌根真菌信号感知的 OsMYR1 和 OsCERK1 的胞外结构域被 MtNFP 和 MtLYK3 的胞外结构域替换后，NF 处理能够引发胞内钙振荡并可以互补 LYK3 等突变体的根瘤表型，增加根瘤菌在转基因水稻的定植 [97]。这表明改造非豆科作物的微生物感知受体可重编程其对根瘤菌共生信号的响应能力。最新研究发现，在根瘤共生过程中，细胞质类受体激酶 MtLICK1/2 与 MtLYK3 通过互相磷酸化激活 NF 受体复合物，启动共生信号转导，并在“共生-免疫”调控中发挥双重功能：共生方面，MtLICK1/2 的激酶活性受 NF 直接调控，介导根瘤菌侵染和根瘤器官的发育；免疫方面，MtLICK1/2 在根瘤菌侵染区被激活，有效抑制植物的免疫反应 [98]。该机制为非豆科作物共生固氮过程中协调共生与免疫提供了参考。

在豆科植物和根瘤菌共生过程中，结瘤器官的发生是共生固氮的关键环节。根瘤器官发生过程中，细胞分裂素能够激活通常不具备分生能力

的皮层细胞的分生活性，这对根瘤器官发生至关重要 [99-100]。外源施加细胞分裂素能在紫花苜蓿和百脉根中诱导形成由皮层细胞衍生的根瘤样结构 (即“假根瘤”)，但这些结构未被细菌侵染 [101-102]。细胞分裂素诱导的假根瘤现象也见于非豆科植物烟草及非豆科放线菌根共生植物赤杨，但具体的机制未知 [103-104]。NIN (Nodule Inception) 是根内皮层细胞中由 Cytokinin Response 1 介导的细胞分裂素信号诱导的转录因子，其可以整合结瘤信号和植物激素信号充当器官发生的转录中枢 [78]。NIN 激活核因子 Y (NF-Y) 亚基编码基因 *NF-YA1* 和 *NF-YA2* 的表达后可激活 *MtERN1* 的转录，进而调控根瘤菌感染的早期阶段和结瘤分生组织的活性，在没有根瘤菌感染的情况下，*nin* 和 NF-Y 亚基编码基因的过表达会诱导皮层细胞的异常分裂并形成根瘤样结构，其发生过程与天然根瘤相似 [105-106]。在豆科植物根发育程序中，LBD16 (Lateral Organ Boundaries-Domain Protein 16) 响应生长素信号促进侧根形态建成 [107]。该发育模块在 NIN 下游被招募至共生过程，LBD16 与 *NF-YA1/NF-YB1* 的过表达在野生型和 *nin* 突变体中自发诱导结瘤样结构 [108-109]。GRAS 家族转录因子 SHR (Short Root) 和 SCR (Scarecrow) 是根发育的关键调节因子，在植物干细胞区域和内皮层中表达，调控干细胞命运决定与维持 [110-111]。MtSHR-MtSCR 模块赋予豆科植物皮层细胞去分化能力，并响应共生信号将完全分化的皮层细胞转变为根瘤原基 [112]。皮层细胞对细胞分裂素和 NIN 的响应也需要 MtSHR-MtSCR 模块的参与，在蒺藜苜蓿和水稻中过表达 MtSHR-MtSCR 会诱导根皮层细胞分裂，从而形成根瘤样结构。上述研究表明豆科植物的结瘤发生是由植物激素、结瘤调控因子和根发育系统等模块协同功能发挥导致的，通过将结瘤相关模块导入非豆科植物中，或可使水稻、玉米等非豆科植物产生根瘤样结构 (图 3)。根瘤结构的微氧环境是根瘤菌进行固氮必需条件，如何在非豆科植物根瘤样结构中维持较低的氧气含量，是其固氮工程必须解决的难题。豆科植物中丰富的血红蛋白是维持微氧环境的关键因素。端木强德团队对根瘤中血红蛋白的合成与降解调控展开了系统的研究，阐明了质体中血红素小分子合成在

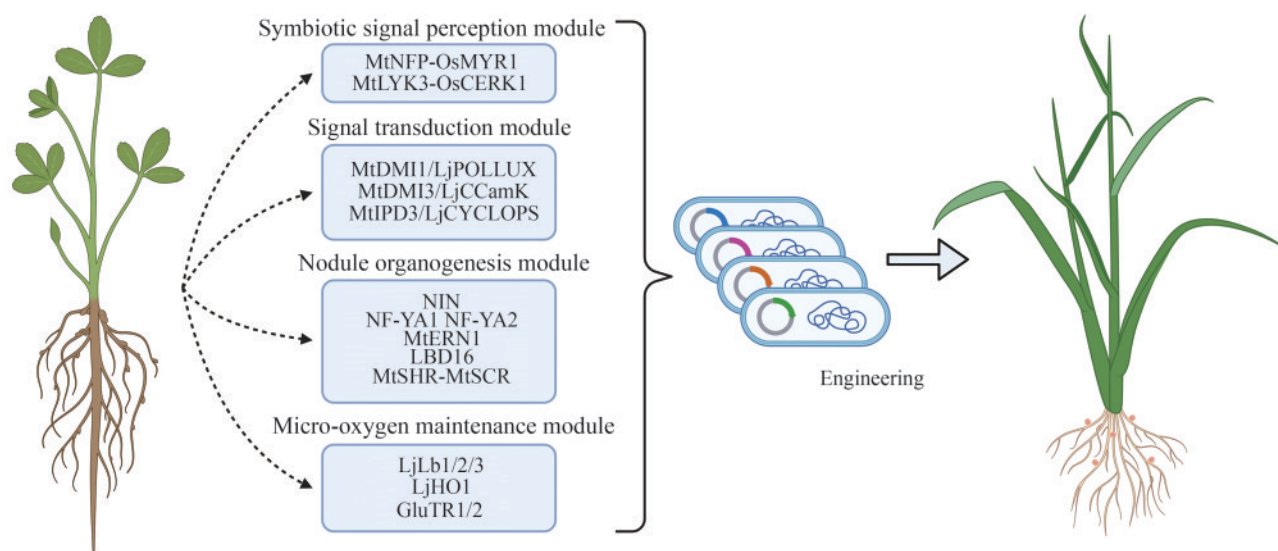


图3 基于根瘤共生机制构建非豆科作物共生固氮模型

Fig. 3 Constructing a symbiotic nitrogen fixation model for non-legume crops based on the nodulation symbiosis mechanism

转录后水平的调控途径和豆科植物根瘤中非侵染细胞定位的血红素加氧酶1 (LjHO1) 分解代谢根瘤血红素的新机制^[113-114]。该课题组最新研究表明, 豆科植物中的谷氨酰-tRNA 还原酶 (GluTR) 协调了固氮根瘤中植物以及共生体的血红素合成^[115]。这些机制的解析为非豆科作物微氧模块设计提供理论基础, 但根瘤器官发生通路与氧调控系统的协同整合仍需进行更深入的研究。

2.4 将固氮基因簇导入植物细胞, 实现植物自主固氮

固氮酶具有高度复杂的组装与电子传递机制, 且对氧极其敏感, 因此, 在植物中重建有功能的固氮酶系统面临巨大挑战。然而, 若能使作物实现自主固氮, 将对农业生产产生颠覆性影响。固氮酶的组装过程已被报道, 在生物固氮过程中固氮酶利用两种主要金属簇将 N_2 还原, 以 *A. vinelandii* 中典型的钼铁固氮酶而言, 其催化组分钼铁蛋白四聚体 NifDK 包含一个 $[Fe_8S_7]$ 核心的 P 簇 (P-cluster) 和一个 $[MoFe_7S_9C-高柠檬酸]$ 辅因子 (称为 M 簇)^[116]。这两种金属簇均来源于 NifS 和 NifU 合成和组装的 $[Fe_4S_4]$ 簇^[117]。P 簇的成熟始于 NifDK 上的一对 $[Fe_4S_4]$ 簇 (称为 P* 簇), 辅助蛋白 NifZ 参与 P 簇的融合过程, 铁蛋白

NifH 促进其发生还原偶联, 最终在 NifDK 的异源二聚体上形成成熟的 P 簇^[118-119]。在 M 簇的生物合成中, NifB 上的两个 $[Fe_4S_4]$ 簇通过自由基 *S*-腺苷甲硫氨酸 (radical-SAM) 依赖的过程与一个碳原子偶联, 并添加硫原子形成 $[Fe_8S_9C]$ 核心的 L 簇, 在支架蛋白 NifEN 上, L 簇通过 NifH 提供的钼和高柠檬酸的添加而成熟为 M 簇, 成熟的 M 簇从 NifEN 转移至 NifDK, 由 NifDK 与 NifH 组装为成熟的固氮酶复合物^[120-121]。但固氮功能的发挥不仅需要完整的固氮酶结构, 还需要完整的电子传递链、足够的能量与微氧环境。不完整的电子传递链无法使固氮酶完成 N_2 的还原。氧气则通过多种机制抑制固氮作用: 高浓度的氧气会抑制 *nif* 基因的表达; 并通过与硫原子结合形成 SO_4^{2-} , 以及氧化 $[Fe_4S_4]$ 簇等方式破坏簇结构, 使 NifH 和 NifDK 失活; 氧气还可与 N_2 竞争结合 FeMo 辅因子的活性空腔, 形成末端氧加合物 (如 $\mu-O$ 桥), 阻断底物结合位点, 并引发后续氧化反应^[122-125]。此外, 氧气在细胞内还可转化为活性氧 (ROS), 如超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($\cdot OH$) 等, 它们会破坏固氮酶的保护蛋白 (如 FeSII) 并导致半胱氨酸的巯基氧化成二硫键和组氨酸的咪唑环羟基化, 破坏蛋白折叠与金属簇配位^[126-128], 最终导致固氮酶失活。因此, 当前的研究策略聚焦于在叶绿体或线粒体内组装固氮酶,

因为这些细胞器能够提供足够的ATP和厌氧环境,最大程度满足固氮酶功能需求^[129-131]。2016年,López-Torrejón等^[132]研究发现厌氧条件下,酵母线粒体可以积累具有活性的NifU和NifH,且在NifM存在时NifH可结合内源性线粒体的Fe-S簇。随后,Burén等^[133]成功地将*A. vinelandii*的9个nif基因(*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifU*、*nifS*、*nifM*、*nifB*、*nifE*和*nifN*)在酵母线粒体中进行表达,并检测到NifDK四聚体的形成,标志着真核细胞线粒体功能性固氮酶构建的起点。2017年,Allen等^[134]在烟草中表达肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)来源的16个nif基因,成功共表达4种靶向烟草线粒体的MTP-Nif融合蛋白(MTP-NifB/S/H/Y),证明固氮酶组分可以靶向植物线粒体并表达。后续Luis M. Rubio等^[135-136]的研究成功实现了固氮酶辅助因子成熟酶NifB在烟草叶绿体和水稻线粒体中的表达。2017年,王忆平团队^[137]使用模块化方法评估了叶绿体、根质体和线粒体中作为钼固氮酶和铁固氮酶系统电子供体的成分,明确植物细胞器的电子传递组分可支持固氮酶活性,实现了植物源电子传递链模块的重构及与固氮酶系统的适配性研究。后续,王忆平团队^[130, 138]揭示了固氮酶核心酶组分NifD蛋白在真核细胞器线粒体中异源表达不稳定的机制,筛选到了在线粒体具有高稳定性的NifD突变体,并进一步创制了基于线粒体信号肽酶的多聚蛋白型固氮酶系统,实现了固氮酶组分在酵母线粒体中的高效、协调表达,这些研究为实现真核系统自主固氮迈进坚实的一步。以上结果确立了在植物细胞内重建完整固氮酶组分可行性。2021年,有学者报道多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)固氮基因簇导入模式植物拟南芥后,在低氮或无氮条件下转基因植株较对照植株生长能力增强^[139],该成果为谷类作物自主固氮提供新路径。近期,中国农业大学陈三凤团队^[140]将来自2个固氮细菌的13个固氮基因(约40 kb)导入水稻,证明了固氮基因在水稻中正常转录并形成固氮酶NifDK四聚体,同时,对NifH蛋白的氨基酸序列进行突变,成功解决了该蛋白在植物细胞质中被蛋白酶切割的问题。该研究在国际上首次实现多基因固氮途径在水稻中的系统性整合,为实现禾本科植物“自主固氮”提供了重要参考。

3 展 望

合成生物学在固氮领域的应用提升了作物产量并部分替代化学氮肥,证明了其在农业可持续发展中的巨大潜力。尽管近年来该领域取得重要进展,固氮合成生物学仍面临不少挑战。

首先,在联合固氮菌工程菌株改造方面,通过增强固氮酶活性和铵的外排能力可显著提高联合固氮菌对宿主作物的供氮效率,但固氮过程的高能耗特性导致过量固氮与铵分泌必然影响菌株的正常生命活动,维持菌体能量供应与氮素输出的平衡是构建高效固氮工程菌必须解决的关键问题。针对这一难题主要有两种解决策略:①通过在固氮工程菌中构建固氮泌铵开关,从而为工程菌预留足够时间缓解过量固氮造成的能量消耗,如王忆平团队通过构建受温度调控的GS工程菌株,维持菌体能量收支平衡的同时促进了植物宿主的生长^[66];②优化固氮工程菌的碳源利用,葡萄糖、琥珀酸和苹果酸等碳源都是固氮菌重要的能量来源,通过筛选工程菌株的优势碳源,并优化碳源的摄取与利用途径,抑制或删减不必要的次生代谢产物通路,可以最大限度地保证工程菌株的能量主要应用到固氮过程中^[141-143]。

其次,在非豆科作物共生固氮方面,这一目标的实现仍有许多问题亟待解决:①需要导入的共生结瘤相关基因的种类和数量尚未明确;②虽已鉴定豆科植物中控制根瘤发育的关键调控基因,但与根瘤菌感染和植物免疫应答相关的基因及其潜在机制仍有待进一步研究,例如在根瘤发育过程中,除了早期启动结瘤的基因,还有哪些信号或功能基因在结瘤中期和末期发挥关键功能还有待发掘;③在非豆科作物的哪些组织器官表达共生固氮植物的基因并控制这些基因的表达水平仍是一个难题;④固氮酶功能的发挥需要微氧环境,如何在非豆科植物器官中创造并维持微氧环境,使根瘤菌在转基因非豆科作物的类根瘤器官中进行固氮仍需进一步研究。针对非豆科作物共生固氮的构建,在根瘤共生与菌根共生机制被完整解析的基础上,将共生相关基因模块组合转入目标作物并研究其共生固氮性状,是本领域研究实现从理论到应用最重要的工作。非豆科作物共生固

氮改造或可分为共生信号感知、共生信号转导、根瘤结构发生和微氧环境维持四个模块。将这四个模块中的重要基因组合系统地导入水稻、玉米等非豆科作物中进行功能验证,是探索非豆科作物共生固氮方案可行性的必要策略。

最后,在植物细胞中表达固氮酶实现作物自主固氮方面,虽然已经成功地在叶绿体和线粒体中表达了部分固氮酶成分,但全酶固氮活性仍未实现,这受限于固氮酶的氧敏感性和多亚基复合体组装的生化复杂性。针对固氮酶的氧敏感性问题,现有的研究表明,在豆科植物根瘤中,豆血红蛋白及其调节因子在保护固氮酶复合物免受氧气侵害方面发挥着关键作用,未来有望改造非豆科作物的血红蛋白的合成与维持以保护细胞固氮酶活性。近期的研究报道解析了固氮菌利用仅13 kDa含铁硫簇的小蛋白Shethna蛋白II(FeS II)对固氮酶进行“构象保护”的机制,这一蛋白或许可以应用于自主固氮作物的构建^[122]。David R. Liu等^[144-146]通过噬菌体辅助连续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE)系统多次对蛋白质进行了定向优化,我们也可利用这一系统,提高固氮酶对氧的耐受性。同时,我们也可以利用AI+计算生物学的策略,对固氮酶进行结构优化与改造,合成氧耐受的固氮酶进行工程应用。固氮合成生物学发展的目的是以生物固氮替代化学氮肥,减少化学氮肥对环境造成的污染,实现农业的绿色可持续发展,但在产品生产应用的过程中,成本与效益评估是不可忽略的。

在固氮菌改造方面,其生产成本主要包括两部分:第一,天然联合固氮菌普遍存在固氮效率低的局限,构建一株能够高效固氮泌铵的工程菌株,并投入到田间生产需要进行大量的菌种资源收集、工程改造与功能验证工作,因此需要大量的科研人力与经费支持。第二,工程菌株的培养与应用成本,工程菌株能够实现产业化的前提是产品能够大量培养并长时间保存,这要求科研人员针对特定的菌株开发发酵工艺和保藏工艺,在工艺改良迭代的过程中同样需要大量的资金与时间投入。虽然固氮工程菌株产品的开发需要一定的成本,但相较于工程化非豆科作物形成根瘤和表达固氮酶的策略,目前短期内固氮工程菌剂在

农业生产系统中更能产生立竿见影的效果,并且优质的固氮工程菌剂能够替代田间大约25%的化学氮肥用量,而在田间生产过程中每减施1 t化学氮肥可节约2800 kg优质煤和1600度电能,具有很高的经济与环境效益^[147-149]。非豆科作物自身固氮改造方面,不管是实现根瘤菌共生固氮还是实现植物自主固氮都需要科研人员长期、持续地努力与科研资金的大量投入。相较于固氮菌工程改造策略,根瘤共生固氮和固氮细胞器固氮均具有极高的固氮效率,在田间生产上,根据豆科植物的根瘤共生固氮效率推测,几乎可以不施加额外的氮肥即可满足作物自身生长需求,相较于科研成本而言,该策略的成功实现带来的经济效益和环境效益不可估量^[10, 13, 22, 23, 146]。目前,王二涛团队已在水稻中完成了共生信号感知模块(MtNFP-OsMYR1, MtLYK3-OsCERK1)的功能验证,并进一步开展了信号转导模块(CSSP)在水稻中的功能验证与性状评估^[97]。David M. Lawson团队在小麦中也验证了菌根共生过程中重要的Ca²⁺信号转导环核苷酸门控通道CNGC15的功能,发现CNGC15的功能性获得突变能够高效增加田间小麦的菌根定植和养分获取^[150]。虽然非豆科作物根瘤结构发育方面还未有突破性的进展,但LBD16、MtSHR-MtSCR等许多根瘤发育相关的基因和细胞分裂素等植物激素在根瘤发育方面的功能已被发掘验证,利用这些基因元件有望系统地构建根瘤发育模块,有可能在非豆科作物中实现根瘤状器官的发生。最后,如何让固氮菌成功地侵染非豆科作物也是一个有待解决的问题。在根瘤共生过程中,豆科植物感知根瘤菌后通过CSSP调控共生相关基因表达与根瘤菌共生结瘤,或可通过通用共生信号通路CSSP调控非豆科作物免疫相关基因表达,提高根瘤菌的侵染能力^[151]。总而言之,固氮合成生物学面临的挑战还需要相关研究机构深化该领域的研究,固氮菌碳氮平衡、植物固氮器官发育、固氮酶氧敏感性等关键问题需要领域内的研究者模块化、系统化地解决。近期报道的根瘤菌*Candidatus Tectiglobus diatomicola*/硅藻*Haslea*的内共生,打破了根瘤菌仅与豆科植物内共生的限制,为根瘤菌与非豆科植物内共生的研究提供了新的参考^[152]。固氮蓝藻UCYN-A/褐藻*Braarudosphaera*

bigelowii 内共生的报道也为固氮合成生物学的发展提供了新的可能^[153]。UCYN-A/*Braarudosphaera bigelowii* 的关系已经超越了内共生, 具有了细胞器的特征, 结合共生固氮蓝藻具有广宿主适应性, 使基于工程化蓝藻构建人工固氮细胞器成为具有潜力的研究方向。近期, 林敏团队^[154] 结合纳米工程技术创建了一种新型的固氮工程菌株, 显著提升了该菌株的根际固氮效率和宿主促生能力。这表明通过生物学、材料学、物理学等各学科技术融合进行技术创新应用, 也是固氮合成生物学突破现有限制进行农业应用的新方向。

参 考 文 献

- [1] ERISMAN J W, SUTTON M A, GALLOWAY J, et al. How a century of ammonia synthesis changed the world[J]. *Nature Geoscience*, 2008, 1(10): 636-639.
- [2] SMIL V. Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production[M]. Cambridge, Mass.: MIT Press, 2000.
- [3] CREWS T E, PEOPLES M B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2004, 102(3): 279-297.
- [4] GALLOWAY J N, TOWNSEND A R, ERISMAN J W, et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions[J]. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [5] ZHANG X, DAVIDSON E A, MAUZERALL D L, et al. Managing nitrogen for sustainable development[J]. *Nature*, 2015, 528(7580): 51-59.
- [6] BULEN W A, LECOMTE J R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 56(3): 979-986.
- [7] XU P, WANG E T. Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants[J]. *Current Biology*, 2023, 33(11): R543-R559.
- [8] DOS SANTOS P C, FANG Z, MASON S W, et al. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 162.
- [9] PATRIARCA E J, TATÈ R, IACCARINO M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 203-222.
- [10] BANO S A, IQBAL S M. Biological nitrogen fixation to improve plant growth and productivity[J]. *International journal of agriculture innovations and research*, 2016, 4(4): 596.
- [11] MUS F, CROOK M B, GARCIA K, et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3698-3710.
- [12] PANKIEVICZ V C S, IRVING T B, MAIA L G S, et al. Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops[J]. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 99.
- [13] SOUMARE A, DIEDHIOU A G, THUITA M, et al. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture[J]. *Plants*, 2020, 9(8): 1011.
- [14] BUENO BATISTA M, DIXON R. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(2): 603-614.
- [15] MONTAÑEZ A, BLANCO A R, BARLOCCO C, et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 58: 21-28.
- [16] ROSENBLUETH M, ORMEÑO-ORRILLO E, LÓPEZ-LÓPEZ A, et al. Nitrogen fixation in cereals[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1794.
- [17] VAN DEYNZE A, ZAMORA P, DELAUX P M, et al. Nitrogen fixation in a Landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(8): e2006352.
- [18] DE LAJUDIE P M, ANDREWS M, ARDLEY J, et al. Minimal standards for the description of new Genera and species of rhizobia and agrobacteria[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(7): 1852-1863.
- [19] MATHESIUS U. Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2022, 276: 153765.
- [20] ZHAO Y 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[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(5): 748-773.
- [21] ANDREWS M, ANDREWS M E. Specificity in legume-

- rhizobia symbioses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 705.
- [22] CREWS T E, PEOPLES M B. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? A review[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2005, 72(2): 101-120.
- [23] GAGE D J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 280-300.
- [24] BARTLEY B A, KIM K, MEDLEY J K, et al. Synthetic biology: engineering living systems from biophysical principles [J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(6): 1050-1058.
- [25] GUPTA D, SHARMA G, SARASWAT P, et al. Synthetic biology in plants, a boon for coming decades[J]. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(12): 1138-1154.
- [26] DAI S Y, FENG W Y, SONG F H, et al. Review of biological algal fertilizer technology: alleviating salinization, sequestering carbon, and improving crop productivity[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 429: 132507.
- [27] SHARMA A, BORA P. Engineering synthetic microbial communities to restructure the phytobiome for plant health and productivity[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2025, 41(7): 228.
- [28] ROCCO C, SUZUKI M, VILAR R, et al. Enhancing zinc bioavailability in rice using the novel synthetic siderophore ligand proline-2'-deoxymugineic acid (PDMA): critical insights from metal binding studies and geochemical speciation modeling[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(14): 8243-8253.
- [29] CHOUDHARY D K, VARMA A. Nitrogenase (a Key Enzyme): structure and function[M]//*Rhizobium biology and biotechnology*. Cham: Springer International Publishing, 2017: 293-307.
- [30] SCHMIDT F V, SCHULZ L, ZARZYCKI J, et al. Structural insights into the iron nitrogenase complex[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2024, 31(1): 150-158.
- [31] SHAH V K, BRILL W J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(8): 3249-3253.
- [32] KIRN J S, REES D C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*[J]. *Nature*, 1992, 360(6404): 553-560.
- [33] REES D C, AKIF TEZCAN F, HAYNES C A, et al. Structural basis of biological nitrogen fixation[J]. *Philosophical Transactions Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 2005, 363(1829): 971-984.
- [34] DIXON R A, POSTGATE J R. Transfer of nitrogen-fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Nature*, 1971, 234(5323): 47-48.
- [35] ZHAN Y H, YAN Y L, DENG Z P, et al. The novel regulatory ncRNA, NfiS, optimizes nitrogen fixation *via* base pairing with the nitrogenase gene *nifK* mRNA in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(30): E4348-E4356.
- [36] WRIGHT G S A, SAEKI A, HIKIMA T, et al. Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system[J]. *Science Signaling*, 2018, 11(525): eaaq0825.
- [37] ZHANG W Y, CHEN Y H, HUANG K Y, et al. Molecular mechanism and agricultural application of the NifA-NifL system for nitrogen fixation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 907.
- [38] LEE S, RETH A, MELETZUS D, et al. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(24): 7088-7091.
- [39] NAREN N, ZHANG X X. Role of a local transcription factor in governing cellular carbon/nitrogen homeostasis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(6): 3204-3216.
- [40] LEE C C, GÓRECKI K, STANG M, et al. Cofactor maturase NifEN: a prototype ancient nitrogenase?[J]. *Science Advances*, 2024, 10(24): eado6169.
- [41] XU Y-Y, JIANG X-L, CHAI J-L, et al. Synthetic models of the nitrogenase FeMo cofactor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(24): e2419655122.
- [42] TEMME K, ZHAO D H, VOIGT C A. Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(18): 7085-7090.
- [43] YANG J G, XIE X Q, XIANG N, et al. Polyprotein strategy for stoichiometric assembly of nitrogen fixation components for synthetic biology[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(36): E8509-E8517.
- [44] VAN HEESWIJK W C, WESTERHOFF H V, BOOGERD F C.

- Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(4): 628-695.
- [45] POOLE P, ALLAWAY D. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2000, 43: 117-163.
- [46] ORTIZ-MARQUEZ J C F, DO NASCIMENTO M, CURATTI L. Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 154-164.
- [47] DE ZAMAROCZY M, PAQUELIN A, ELMERICH C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(9): 2507-2515.
- [48] DE ZAMAROCZY M. Structural homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(2): 449-463.
- [49] JAGGI R, VAN HEESWIJK W C, WESTERHOFF H V, et al. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(18): 5562-5571.
- [50] JIANG P, PIOSZAK A A, NINFA A J. Structure-function analysis of glutamine synthetase adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(13): 4117-4132.
- [51] WANG Y L, LIU F, WANG W. Kinetics of transcription initiation directed by multiple cis-regulatory elements on the *glnAp2* promoter[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(22): 10530-10538.
- [52] HUERGO L F, SOUZA E M, STEFFENS M B R, et al. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(1): 33-40.
- [53] HUERGO L F, PEDROSA F O, MULLER-SANTOS M, et al. P(II) signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity[J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 1): 176-190.
- [54] MOURE V R, SIÖBERG C L B, VALDAMERI G, et al. The ammonium transporter AmtB and the P(II) signal transduction protein GlnZ are required to inhibit DraG in *Azospirillum brasilense*[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(6): 1214-1229.
- [55] MOURE V R, DANYAL K, YANG Z Y, et al. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(2): 279-286.
- [56] ZHANG Y P, POHLMANN E L, ROBERTS G P. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4): 1254-1265.
- [57] AMBROSIO R, ORTIZ-MARQUEZ J C F, CURATTI L. Metabolic engineering of a diazotrophic bacterium improves ammonium release and biofertilization of plants and microalgae [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 59-68.
- [58] MICHEL-REYDELLET N, KAMINSKI P A. *Azorhizobium caulinodans* P(II) and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2655-2658.
- [59] MUS F, TSENG A, DIXON R, et al. Diazotrophic growth allows *Azotobacter vinelandii* to overcome the deleterious effects of a *glnE* deletion[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00808-17.
- [60] SCHNABEL T, SATTELY E. Engineering posttranslational regulation of glutamine synthetase for controllable ammonia production in the plant symbiont *Azospirillum brasilense*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(14): e00582-21.
- [61] HASKETT T L, KARUNAKARAN R, BUENO BATISTA M, et al. Control of nitrogen fixation and ammonia excretion in *Azorhizobium caulinodans*[J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(6): e1010276.
- [62] ZHANG T, YAN Y L, HE S, et al. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. *Research in Microbiology*, 2012, 163(5): 332-339.
- [63] BALI A, BLANCO G, HILL S, et al. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(5): 1711-1718.
- [64] BREWIN B, WOODLEY P, DRUMMOND M. The basis of ammonium release in *nifL* mutants of *Azotobacter vinelandii* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(23): 7356-7362.
- [65] LI Q, ZHANG H W, SONG Y, et al. Alanine synthesized by alanine dehydrogenase enables ammonium-tolerant nitrogen fixation in *Paenibacillus sabiniae* T27[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(49): e2215855119.

- [66] TANG Y Q, QIN D B, TIAN Z X, et al. Diurnal switches in diazotrophic lifestyle increase nitrogen contribution to cereals [J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 7516.
- [67] BRAUTASET T, LALE R, VALLA S. Positively regulated bacterial expression systems[J]. *Microbial Biotechnology*, 2009, 2(1): 15-30.
- [68] KENT R, DIXON N. Contemporary tools for regulating gene expression in bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(3): 316-333.
- [69] FRAY R G, THROUP J P, DAYKIN M, et al. Plants genetically modified to produce *N*-acylhomoserine lactones communicate with bacteria[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 1017-1020.
- [70] MURPHY P J, WEXLER W, GRZEMSKI W, et al. Rhizopines: their role in symbiosis and competition[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(4-5): 525-529.
- [71] MURPHY P J, TRENZ S P, GRZEMSKI W, et al. The *Rhizobium meliloti* rhizopine mos locus is a mosaic structure facilitating its symbiotic regulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(16): 5193-5204.
- [72] GORDON D M A N, RYDER M H, HEINRICH K, et al. An experimental test of the rhizopine concept in *Rhizobium meliloti*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 3991-3996.
- [73] WEXLER M, GORDON D, MURPHY P J. The distribution of inositol rhizopine genes in *Rhizobium* populations[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(4-5): 531-537.
- [74] MURPHY P J, HEYCKE N, BANFALVI Z, et al. Genes for the catabolism and synthesis of an opine-like compound in *Rhizobium meliloti* are closely linked and on the Sym plasmid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(2): 493-497.
- [75] GEDDES B A, PARAMASIVAN P, JOFFRIN A, et al. Engineering transkingdom signalling in plants to control gene expression in rhizosphere bacteria[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3430.
- [76] HASKETT T L, PARAMASIVAN P, MENDES M D, et al. Engineered plant control of associative nitrogen fixation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(16): e2117465119.
- [77] ROY S, LIU W, NANDETY R S, et al. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(1): 15-41.
- [78] YANG J, LAN L Y, JIN Y, et al. Mechanisms underlying legume—*Rhizobium* symbioses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 244-267.
- [79] SUBRAMANIAN S, STACEY G, YU O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(7): 282-285.
- [80] VENKATESHWARAN M, VOLKENING J D, SUSSMAN M R, et al. Symbiosis and the social network of higher plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(1): 118-127.
- [81] GENRE A, RUSSO G. Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions?[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 96.
- [82] MADSEN E B, MADSEN L H, RADUTOIU S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 637-640.
- [83] SMIT P, LIMPENS E, GEURTS R, et al. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 183-191.
- [84] OLDROYD G E D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 252-263.
- [85] MARTIN F M, UROZ S, BARKER D G. Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria[J]. *Science*, 2017, 356(6340): eaad4501.
- [86] LÉVY J, BRES C, GEURTS R, et al. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1361-1364.
- [87] GLEASON C, CHAUDHURI S, YANG T B, et al. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition[J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1149-1152.
- [88] TIRICHINE L, IMAIZUMI-ANRAKU H, YOSHIDA S, et al. Dereglulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development[J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1153-1156.
- [89] JIN Y, LIU H, LUO D X, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12433.
- [90] SINGH S, KATZER K, LAMBERT J, et al. *CYCLOPS*, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(2): 139-152.
- [91] YANO K, YOSHIDA S, MÜLLER J, et al. *CYCLOPS*, a mediator of symbiotic intracellular accommodation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(51): 20540-20545.
- [92] DELWICHE C F, COOPER E D. The evolutionary origin of a

- terrestrial flora[J]. *Current Biology*, 2015, 25(19): R899-R910.
- [93] PARNISKE M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(10): 763-775.
- [94] GENRE A, LANFRANCO L, PEROTTO S, et al. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 649-660.
- [95] SHI J C, WANG X L, WANG E T. Mycorrhizal symbiosis in plant growth and stress adaptation: from genes to ecosystems [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2023, 74: 569-607.
- [96] WANG W, XIE Z P, STAEHELIN C. Functional analysis of chimeric lysin motif domain receptors mediating Nod factor-induced defense signaling in *Arabidopsis thaliana* and chitin-induced nodulation signaling in *Lotus japonicus*[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 56-69.
- [97] HE J M, ZHANG C, DAI H L, et al. A LysM receptor heteromer mediates perception of arbuscular mycorrhizal symbiotic signal in rice[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(12): 1561-1576.
- [98] WANG D P, JIN R, SHI X B, et al. A kinase mediator of rhizobial symbiosis and immunity in *Medicago*[J]. *Nature*, 2025, 643(8072): 768-775.
- [99] GAMAS P, BRAULT M, JARDINAUD M F, et al. Cytokinins in symbiotic nodulation: when, where, what for?[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(9): 792-802.
- [100] ARIEL F, BRAULT-HERNANDEZ M, LAFFONT C, et al. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(9): 3838-3852.
- [101] HECKMANN A B, SANDAL N, BEK A S, et al. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(11): 1385-1395.
- [102] HIRSCH A M, FANG Y, ASAD S, et al. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses[J]. *Plant and Soil*, 1997, 194(1): 171-184.
- [103] ARORA N, SKOOG F, ALLEN O N. Kinetin-induced pseudonodules on tobacco roots[J]. *American Journal of Botany*, 1959, 46(8): 610-613.
- [104] RODRIGUEZ-BARRUECO C, DE CASTRO F B. Cytokinin-induced pseudonodules on *Alnus glutinosa*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1973, 29(2): 277-280.
- [105] SOYANO T, KOUCHI H, HIROTA A, et al. Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(3): e1003352.
- [106] LALOUM T, BAUDIN M, FRANCES L, et al. Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis[J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(5): 757-768.
- [107] GOH T, JOI S, MIMURA T, et al. The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins[J]. *Development*, 2012, 139(5): 883-893.
- [108] 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*[J]. *Current Biology*, 2019, 29(21): 3657-3668.e5.
- [109] SOYANO T, SHIMODA Y, KAWAGUCHI M, et al. A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in *Lotus*[J]. *Science*, 2019, 366(6468): 1021-1023.
- [110] DI LAURENZIO L, WYSOCKA-DILLER J, MALAMY J E, et al. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root[J]. *Cell*, 1996, 86(3): 423-433.
- [111] HELARIUTTA Y, FUKAKI H, WYSOCKA-DILLER J, et al. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling[J]. *Cell*, 2000, 101(5): 555-567.
- [112] DONG W T, ZHU Y Y, CHANG H Z, et al. An SHR-SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 586-590.
- [113] WANG L L, RUBIO M C, XIN X, et al. CRISPR/Cas9 knockout of leghemoglobin genes in *Lotus japonicus* uncovers their synergistic roles in symbiotic nitrogen fixation[J]. *New Phytologist*, 2019, 224(2): 818-832.
- [114] ZHOU Y, WANG L L, RUBIO M C, et al. Heme catabolism mediated by heme oxygenase in uninfected interstitial cells enables efficient symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(5): 1989-2006.
- [115] WANG L L, TIAN T, DENG Y, et al. Plant glutamyl-tRNA reductases coordinate plant and rhizobial heme biosynthesis in nitrogen-fixing nodules[J]. *The Plant Cell*, 2025, 37(5): koaf095.
- [116] HOFFMAN B M, LUKOYANOV D, YANG Z Y, et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4041-4062.
- [117] RIBBE M W, HU Y L, HODGSON K O, et al. Biosynthesis of nitrogenase metalloclusters[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114

- (8): 4063-4080.
- [118] HU Y L, FAY A W, DOS SANTOS P C, et al. Characterization of *Azotobacter vinelandii* *nifZ* deletion strains. Indication of stepwise MoFe protein assembly[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(52): 54963-54971.
- [119] HU Y L, FAY A W, LEE C C, et al. P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(25): 10424-10429.
- [120] WIIG J A, HU Y L, RIBBE M W. Refining the pathway of carbide insertion into the nitrogenase M-cluster[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8034.
- [121] FAY A W, BLANK M A, REBELEIN J G, et al. Assembly scaffold NifEN: a structural and functional homolog of the nitrogenase catalytic component[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(34): 9504-9508.
- [122] FRANKE P, FREIBERGER S, ZHANG L, et al. Conformational protection of molybdenum nitrogenase by Shethna protein II [J]. Nature, 2025, 637(8047): 998-1004.
- [123] GALLON J R. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1981, 6: 19-23.
- [124] NAREHOOD S M, COOK B D, SRISANTITHAM S, et al. Structural basis for the conformational protection of nitrogenase from O₂[J]. Nature, 2025, 637(8047): 991-997.
- [125] POOLE R K, HILL S. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*: roles of the terminal oxidases [J]. Bioscience Reports, 1997, 17(3): 303-317.
- [126] ROBSON R L, POSTGATE J R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation[J]. Annual Review of Microbiology, 1980, 34: 183-207.
- [127] WITTENBERG J B. Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(13): 4057-4066.
- [128] TAKIMOTO R, TATEMICHY Y, AOKI W, et al. A critical role of an oxygen-responsive gene for aerobic nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* and its application to *Escherichia coli* [J]. Scientific Reports, 2022, 12: 4182.
- [129] GOOD A. Toward nitrogen-fixing plants[J]. Science, 2018, 359(6378): 869-870.
- [130] XIANG N, GUO C Y, LIU J W, et al. Using synthetic biology to overcome barriers to stable expression of nitrogenase in eukaryotic organelles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(28): 16537-16545.
- [131] SOTO G, FOX A R, AYUB N D. Exploring the intrinsic limits of nitrogenase transfer from bacteria to eukaryotes[J]. Journal of Molecular Evolution, 2013, 77(1): 3-7.
- [132] LÓPEZ-TORREJÓN G, JIMÉNEZ-VICENTE E, BUESA J M, et al. Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11426.
- [133] BURÉN S, YOUNG E M, SWEENEY E A, et al. Formation of nitrogenase NifDK tetramers in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(6): 1043-1055.
- [134] ALLEN R S, TILBROOK K, WARDEN A C, et al. Expression of 16 nitrogenase proteins within the plant mitochondrial matrix[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 287.
- [135] HE W S, BURÉN S, BAYSAL C, et al. Nitrogenase cofactor maturase NifB isolated from transgenic rice is active in FeMo-co synthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(9): 3028-3036.
- [136] JIANG X, COROIAN D, BARAHONA E, et al. Functional nitrogenase cofactor maturase NifB in mitochondria and chloroplasts of *Nicotiana benthamiana*[J]. mBio, 2022, 13(3): e00268-22
- [137] YANG J G, XIE X Q, YANG M X, et al. Modular electron-transport chains from eukaryotic organelles function to support nitrogenase activity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(12): E2460-E2465.
- [138] YANG J G, XIANG N, LIU Y H, et al. Organelle-dependent polyprotein designs enable stoichiometric expression of nitrogen fixation components targeted to mitochondria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(34): e2305142120.
- [139] YAO Q H, PENG R H, WANG B, et al. Endowing plants with the capacity for autogenic nitrogen fixation[EB/OL]. Research Square, 2021. (2021-05-07) [2025-09-01]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-436726/v1>.
- [140] SHANG Y M, SHI H W, LIU M Z, et al. Using synthetic biology to express nitrogenase biosynthesis pathway in rice and to overcome barriers of nitrogenase instability in plant cytosol[J]. Trends in Biotechnology, 2025, 43(4): 946-968.
- [141] SCHULTE C C M, BORAH K, WHEATLEY R M, et al. Metabolic control of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbioses[J]. Science Advances, 2021, 7(31): eabh2433.

- [142] ZHAO Q, WANG J P, HE Q Q, et al. Carbon type and quantity regulate soil free-living nitrogen fixation through restructuring diazotrophic community[J]. *Applied Soil Ecology*, 2024, 202: 105586.
- [143] LV F Y, ZHAN Y H, LU W, et al. Regulation of hierarchical carbon substrate utilization, nitrogen fixation, and root colonization by the Hfq/Crc/CrcZY genes in *Pseudomonas stutzeri*[J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105663.
- [144] WITTE I P, LAMPE G D, EITZINGER S, et al. Programmable gene insertion in human cells with a laboratory-evolved CRISPR-associated transposase[J]. *Science*, 2025, 388(6748): eadt5199.
- [145] DOMAN J L, PANDEY S, NEUGEBAUER M E, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors[J]. *Cell*, 2023, 186(18): 3983-4002.e26.
- [146] MILLER S M, WANG T N, LIU D R. Phage-assisted continuous and non-continuous evolution[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(12): 4101-4127.
- [147] BEATTY P H, GOOD A G. Plant science. Future prospects for cereals that fix nitrogen[J]. *Science*, 2011, 333(6041): 416-417.
- [148] BLOCH S E, RYU M H, OZAYDIN B, et al. Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 181-188.
- [149] 燕永亮, 田长富, 杨建国, 等. 人工高效生物固氮体系创建及其农业应用[J]. *生命科学*, 2021, 33(12): 1532-1543.
- YAN Y L, TIAN C F, YANG J G, et al. Establishment of artificial efficiency biological nitrogen fixation system and its agricultural application[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2021, 33(12): 1532-1543.
- [150] COOK N M, GOBBATO G, JACOTT C N, et al. Autoactive CNGC15 enhances root endosymbiosis in legume and wheat [J]. *Nature*, 2025, 638(8051): 752-759.
- [151] GAUTRAT P, LAFFONT C, FRUGIER F, et al. Nitrogen systemic signaling: from symbiotic nodulation to root acquisition[J]. *Trends in Plant Science*, 2021, 26(4): 392-406.
- [152] TSCHITSCHKO B, ESTI M, PHILIPPI M, et al. Rhizobia-diatom symbiosis fixes missing nitrogen in the ocean[J]. *Nature*, 2024, 630(8018): 899-904.
- [153] COALE T H, LOCONTE V, TURK-KUBO K A, et al.

Nitrogen-fixing organelle in a marine *Alga*[J]. *Science*, 2024, 384(6692): 217-222.

- [154] LI J J, CHEN W X, LU Z Z, et al. Nanoengineered *Azotobacter Pseudomonas stutzeri* A1501 for soil ecology restoration and biological nitrogen fixation[J]. *ACS Nano*, 2025, 19(19): 18143-18155.



通讯作者: 王二涛(1979—),男,研究员,博士生导师。研究方向为植物-微生物共生及相关激素信号转导,从事模式植物水稻、苜蓿-菌根真菌共生的分子机理;豆科植物-根瘤菌共生固氮的分子机理;植物根际微生物群组装和利用;非豆科植物水稻、玉米和小麦结瘤固氮可行性的探讨方向的研究。

E-mail: etwang@cemps.ac.cn



共同通讯作者: 杨军(1973—),男,正高级工程师,硕士生导师。研究方向为蒺藜苜蓿-根瘤菌共生的分子机制,以及非豆科植物生物固氮改造的可行性探索。

E-mail: jyang@cemps.ac.cn



第一作者: 李超(1999—),男,博士研究生。研究方向为非豆科植物水稻的高效固氮共生改造。

E-mail: lchao@cemps.ac.cn



共同第一作者: 张焕(1993—),女,博士。研究方向为利用合成生物技术,实现水稻、玉米和小麦等非豆科植物的高效共生固氮。

E-mail: zhanghuan@cemps.ac.cn