中国科学: 生命科学 2026 年 第 56 卷 第 3 期: 607 ~ 617
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述

根瘤共生固氮进化假说研究进展与展望

任健[1,2,3], 高英志[1,3*]

1. 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
2. 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心), 农业资源与环境研究所, 长春 130033
3. 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, 植被生态科学教育部重点实验室, 长春 130024
* 联系人, E-mail: gaoyz108@nenu.edu.cn

收稿日期: 2025-09-19; 接受日期: 2025-12-04; 网络版发表日期: 2026-03-03
国家重点研发计划(批准号: 2025YFE0103800)、国家自然科学基金(批准号: W2412123, 32271579)和新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(批准号: 2023E01008)资助

摘要 部分被子植物能够与固氮微生物建立共生关系, 固定大气中的氮气来满足宿主生长发育对氮元素的需求. 然而, 具有结瘤能力植物仅限于“固氮结瘤分支”内, 且镶嵌分布于该分支四个目中的若干植物科. 针对结瘤植物局限且零散的分布格局, 目前主要有两种竞争性假说: 结瘤多次获得假说与结瘤单次获得假说. 本文通过系统整合两种假说已经证实的多项证据, 试图还原根瘤共生进化的原始情景. 综合分子生物学与系统发育学证据, 根瘤起源依赖于5项关键的进化创新, 包括宿主植物免疫抑制机制启动、顺式调控元件*PACE*(predisposition-associated *cis*-regulatory element)获得、*NIN*(nodule inception)基因结瘤功能化、SHORTROOT-SCARECROW干细胞模块的招募, 以及NOD26(nodulin-26)的进化特化. 同时, 细胞内共生关系的遗传基础高度保守, 使共生根瘤进化趋于稳定. 这些分子与发育层面的创新为两种假说的发展提供进化线索, 对固氮共生根瘤的起源与进化带来新的理解与启示.

关键词 根瘤, 共生固氮, 固氮结瘤分支, 固氮进化

氮是植物生长发育过程中最关键的元素之一, 参与调控多种生理功能. 尽管大气中氮气含量极为丰富, 但由于其化学性质稳定, 必须经过生物固定作用转化后, 才能被植物吸收利用. 自然界中存在两类主要的共生固氮体系, 第一类是植物与蓝藻之间的共生, 共生物种间不形成明显的瘤状结构[1]; 第二类为被子植物与两类真细菌之间的共生, 通常根瘤菌或放线菌在宿主根系上形成明显的共生根瘤[2,3]. 上述两类固氮共生体系均促进植物对大气氮素的固定与利用, 但其分布模式却存在显著的谱系差异: 植物与蓝藻的共生在陆地生态系统中分布较为广泛, 而根瘤共生则仅局限于特定的“固氮结瘤分支(nitrogen-fixing nodulation clade, NFNC)”.

NFNC位于被子植物系统发育分类系统中的Rosid I支系, 仅包含四个目, 即豆目(Fabales)、壳斗目(Fagales)、葫芦目(Cucurbitales)和蔷薇目(Rosales)(图1)[4~6]. 该分支共有28个科, 其中仅10个科具有根瘤共生的能力, 且这些科并不构成单系类群[7]. 此外, 在这

引用格式: 任健, 高英志. 根瘤共生固氮进化假说研究进展与展望. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 607–617
Ren J, Gao Y Z. Advances and perspectives in the evolutionary hypothesis of root nodule symbiosis (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 607–617, doi: 10.1360/SSV-2025-0222

© 2026《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

10个科中, 除了豆科, 其他9个科的大多数属并不会形成根瘤. 虽然对共生根瘤起源做了大量的研究, 但NFNC中结瘤植物呈现镶嵌式分布的原因仍不清楚. 针对该现象形成的原因, 目前主要存在两种竞争性解释假说: 结瘤多次独立获得假说与结瘤单次获得假说[8,9]. 考虑到培育和改良固氮作物对农业生产和生态环境治理具有重要的应用价值, 如果根瘤共生属于多次独立起源, 则结瘤共生相关特性在不同谱系中的独立进化意味着改良作物的目标更易实现. 因此, 明确根瘤共生起源不仅具有理论上的重要性, 也对生产实践应用具有重大的现实意义.

1 根瘤共生固氮进化假说

根瘤共生固氮进化假说包括结瘤多次获得假说和结瘤单次获得假说. 结瘤多次获得假说认为在最近的NFNC祖先中发生了一次“结瘤易感性(nodulation predisposition)”事件, 随后在多个分类群中发生根瘤的平行进化. 结瘤单次获得假说认为NFNC的祖先已经形成根瘤, 随后在多个谱系中发生根瘤的平行丧失[10,11]. 这两种假说是当前共生根瘤起源研究中主要的解释框架, 其对根瘤共生进化路径的解释存在显著差异. 为了更清晰地理解两种假说的内涵和要义, 本研究将分别对其进行详细阐述.

1.1 结瘤多次获得假说

该假说认为, 共生根瘤的进化可以总结为一个两步模型(图1; 网络版附图1和附图2). 首先, NFNC的祖先大概在1.1亿年前获得一种尚未明确的“结瘤易感性”, 这为固氮根瘤提供必要的遗传背景, 称其为“前体性状(precursor trait)”. 随后, 在至少3000万年之后, 根瘤在NFNC中的6~10个不同谱系中趋同进化[5,12,13]. 这些结瘤谱系中的大多数植物与弗兰克氏菌(*Frankia*)共生, 但其中两个谱系与根瘤菌共生[5]. 该假说目前获得以下证据支持:

(ⅰ) 结瘤易感性状共同起源. 对3种不同谱系植物的根与根瘤转录组研究发现, 根瘤转录组之间的相似性高于偶然水平. NFNC系统发育树早期分支存在多次选择压力的转变, 这支持易感性状在共同祖先中起源的观点. 各个结瘤谱系中也检测到独立的选择压力变化, 表明根瘤性状可能在不同谱系中独立进化[14].

(ⅱ) 系统发育祖先状态重建. Kates与多名知名科学家一起对NFNC中结瘤植物的分布进行全面研究, 构建了包含大约13000个结瘤物种的结瘤状况数据库, 并利用更新版的隐藏速率模型进行建模分析[4,15,16]. 这项研究是目前结瘤进化建模最前沿进展, 其最佳模型识别出NFNC中有16次独立结瘤起源, 以及只有10次结瘤丧失, 并且所有丧失均发生在豆科植物中. (ⅲ) 共生微生物受控程度不同. 相比于放线菌植物, 豆科植物对共生微生物的控制程度更强[17,18]. 豆科植物的类菌体新陈代谢能力较低, 宿主对生化过程具有更多的控制权[19,20]. (ⅳ) 根瘤生长发育与生理机制差异巨大. 豆科植物根瘤起源于去分化的皮层细胞, 具有围绕中央感染细胞区的外围维管束; 而放线菌结瘤植物的根瘤则起始于中柱鞘细胞的分裂, 维管束位于中心, 感染细胞分布在外围[2,3,5]. 不同结瘤类型植物维管结构的差异直接影响固氮效率, 豆科植物的外围维管束与豆血红蛋白的氧调控机制配合, 使根瘤微环境能够高效维持低氧条件, 从而促进固氮成功; 相较之下, 放线菌结瘤植物的中央维管束被低氧的感染细胞包围, 导致维管组织易陷入缺氧、能量供应不足的状态, 在进化上处于劣势[21]. 此外, 两类结瘤系统在激素信号和氧气调控等方面表现出显著差异. 豆科植物对细胞分裂素信号依赖更强, 能够通过外源分裂素诱导假结瘤, 而放线菌结瘤植物中则缺乏这一反应机制. 在氧调控方面, 放线菌采取与豆科完全不同的策略, 一些弗兰克氏菌株形成囊泡作为物理屏障隔绝氧气, 另一些则利用截短的血红蛋白HbO调节氧平衡, 甚至结合多种机制协同作用; 相比之下, 豆科植物、木麻黄以及少数非豆科结瘤植物(如山黄麻属, *Parasponia*)则依赖不同类别的豆血红蛋白基因(Ⅰ类: 山黄麻属; Ⅱ类: 豆科与木麻黄)作为氧气运输器, 实现对固氮酶的保护和氧气平衡的调节[11].

综上可知, 虽然结瘤多次获得假说可以解释部分现象, 但仍存在以下诸多挑战. (ⅰ) 结瘤易感性设想缺乏实验验证. 尽管该假说已被提出数十年, 但结瘤易感性仍主要停留在建模阶段, 缺乏直接的实验证据支持[11]. (ⅱ) 共同共生信号通路不易阐明多次独立招募. 共同共生信号(common symbiosis signaling pathway, CSSP)是植物与共生微生物建立互利共生关系时, 植物细胞内保守的一类信号转导机制(图2). 结瘤多次获得假说要求CSSP在不同结瘤谱系中被多次平行独立

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

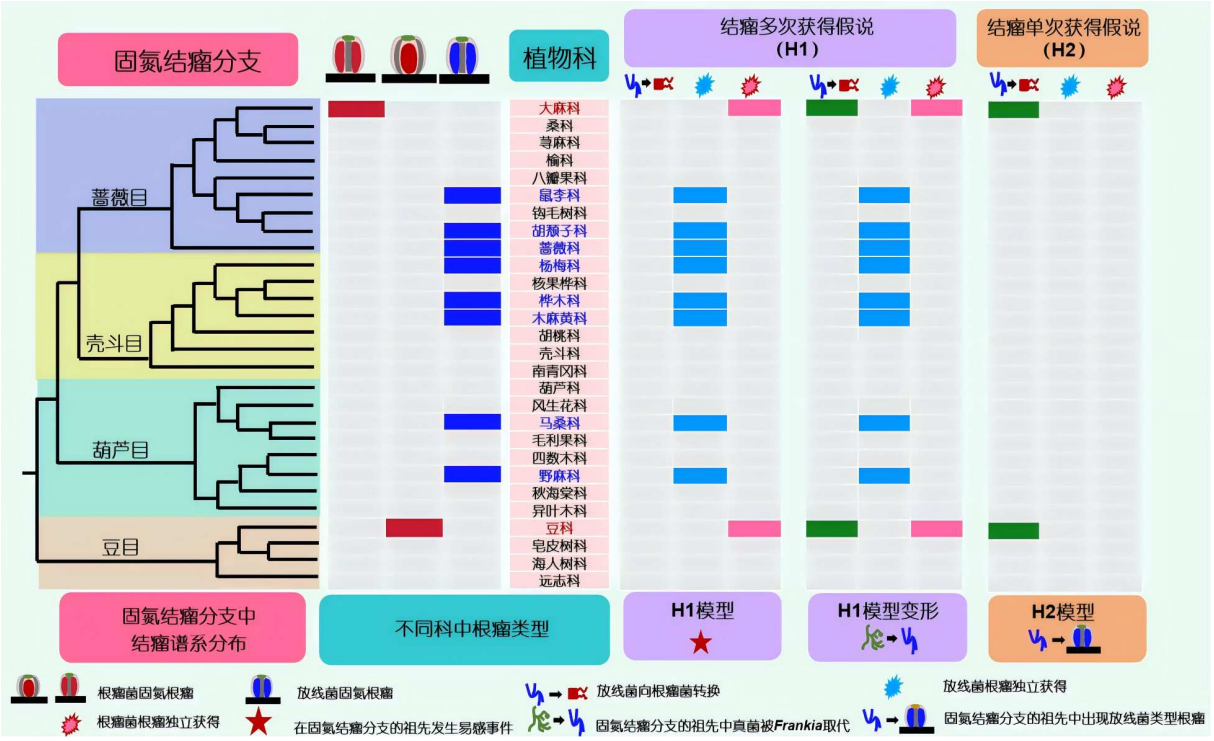


图 1　固氮共生根瘤进化假说

Figure 1　The evolutionary hypothesis of nitrogen-fixing symbiotic root nodules

招募以介导细菌侵染[2,22,23]. 然而, 在木麻黄(*Casuarina glauca*)与北美假大麻(*Datisca glomerata*)中发现, 结瘤必需共生受体激酶SYMRK(symbiosis receptor-like kinase)[24,25]. 木麻黄中CCaMK(calcium/calmodulin-dependent protein kinase)的自激活形式与豆科植物类似, 其在木麻黄中诱导自发性根瘤形成, 并且该构建体同样可诱导鼠李科植物*Discaria trinervis*产生根瘤[26]. 这些结果表明, CSSP在这些谱系的共同祖先中已具备基本功能, 平行招募的可能性需重新评估. (iii) 趋同进化难以解释根瘤转录组高度一致. 对糙叶山黄麻与蒺藜苜蓿根瘤转录组进行比较分析, 鉴定出两者共有290个推测的直系同源基因[5], 这表明它们在根瘤发育过程中具有保守功能. 如此高度的一致性难以通过趋同进化合理解释. 趋同进化所要求的遗传路径重构及调控网络的同步进化在理论与实证层面均面临巨大的挑战. (iv) 宿主单一起源与共生菌多样性相互矛盾. 豆科植物的系统发育分析表明, 蝶形花亚科具有明确的单一起源, 但其相关的根瘤菌在系统分类上高度多样, 无论是在16S rRNA还是结瘤因子基因系统发育树上均体现这一特点[27]. 这一结果反驳了“微共生体多样性即表明宿主多次起源”的观点[3,28]. (v) 系统发育模型低估结瘤性状丧失概率. 在祖先状态重建的建模研究中, 通常预设性状的获得与丧失具有相同的概率. 然而, 这一假设条件存在明显局限性. 鉴于固氮根瘤在结构与遗传上的高度复杂性, 其在进化过程中“获得”的难度远高于“丧失”[29,30]. 已有研究指出, 单一基因的失活突变(如*NFP*/*NFR5*, *NIN*, *RPG*)即可导致功能性根瘤的丧失[11], 而获得这一复杂性状则需要多基因的协同演化. 因此, 如果直接采用等权重假设, 势必会低估根瘤性状的丧失频率.

Mergaert等人[23]对多次获得假说中的两步模型进行了变形, 拓宽了根瘤多次起源的认识路径. 其将原假说中所设想的“结瘤易感性”定义为弗兰克氏菌对NFNC祖先的侵染事件. 此后, 在豆科植物和山黄麻属中, 弗兰克氏菌被根瘤菌所取代, 最终驱动固氮共生根瘤在多个谱系中独立进化(图1). 目前, NFNC中许多谱系没有结瘤, 可能是早期弗兰克氏菌共生体的缺失, 进而导致根瘤的丧失. 糙叶山黄麻与蒺藜苜蓿中共生基

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

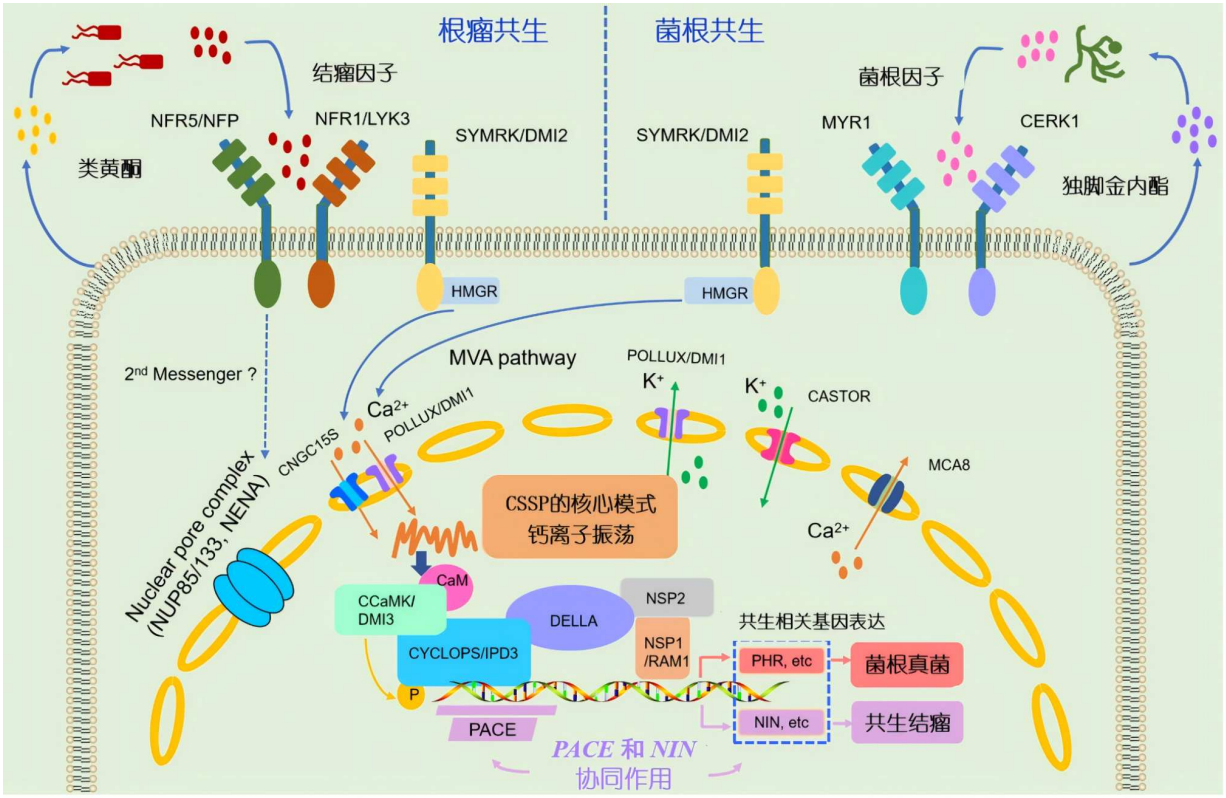


图 2 共同共生信号模型. 在质膜感知到结瘤因子之后, 共同共生信号被激活, 这一过程也在丛枝菌根共生中共有. 该通路将信号传递至细胞核, 引发与细胞核相关的钙震荡, 这是CSSP的核心特征, 从而启动后续的转录反应. NFR1/5: 结瘤因子受体1/5; LYK3: LysM型受体激酶3; NFP: 结瘤因子感知蛋白; DMI2: 不形成侵染突变体2; HMGR: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶; MVA: 甲羟戊酸途径; CNGC15a/b/c: 环核苷酸门控离子通道15a/b/c; NiCK4: NFR5相互作用的细胞质激酶4; RLCKs: 受体样细胞质激酶; CaM: 钙调蛋白; IPD3: DMI3相互作用蛋白; DELLA: DELLA蛋白; NSP1/2: 结瘤信号通路蛋白1/2; MYR1: 菌根因子受体1; CERK1: 几丁质诱导受体激酶1; RAM1: 丛枝菌根形成相关蛋白1; PHR: 磷饥饿响应调控因子

Figure 2 The CSSP model. Upon perception of Nod factors at the plasma membrane, the common symbiosis signaling pathway is activated, a process also shared in arbuscular mycorrhizal symbiosis. This pathway transmits signals to the nucleus, triggering nuclear-associated calcium spiking, which is a hallmark of the CSSP and initiates subsequent transcriptional responses. NFR1/5: Nod factor receptor 1/5; LYK3: LysM receptor kinase 3; NFP: Nod factor perception, DMI2: does not make infections 2; HMGR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; MVA: mevalonate; CNGC15a/b/c: cyclic nucleotide-gated channels 5a/b/c; NiCK4: NFR5-interacting cytoplasmic kinase 4; RLCKs: receptor-like cytoplasmic kinases; CaM: calmodulin; IPD3: interacting protein of DMI3; DELLA: DELLA proteins; NSP1/2: nodulation signaling pathway 1/2; MYR1: Myc factor receptor 1; CERK1: chitin elicitor receptor kinase 1; RAM1: arbuscular mycorrhization 1; PHR: phosphate starvation response

因的功能存在诸多共同点, 表明这些调控基因在菌根真菌中早已执行共生功能. 尽管它们的根瘤表达基因存在部分重叠, 但不同植物根瘤特异性转录组差异很大, 说明根瘤的发生沿着不同的进化路径进行[5,14,31]. 此外, 考虑到根瘤结构的多样性, 以及结瘤植物不同谱系的共同祖先与已知最早根瘤化石之间存在较远进化时间间隔, 推测根瘤器官出现发生较晚, 并在多个谱系中多次独立发生[12].

1.2 结瘤单次获得假说

随着比较基因组技术对结瘤谱系及非结瘤谱系结瘤关键基因的鉴定与挖掘, 科学家提出“结瘤单次获得假说”(图1; 网络版附图3)[5,10]. 该假说认为, NFNC中的最近共同结瘤祖先已与弗兰克氏菌共生形成固氮根瘤, 随后结瘤谱系发生根瘤性状的大规模多次丧失. 该假说与多次获得假说中的“Mergaert版本”具有相似的进化情景, 均认为在结瘤谱系多样化后存在微共生体的替换. 微共生体的替换能否顺利进行, 可能主要依靠宿主对豆血红蛋白基因的招募来维持根瘤中的氧气稳态[21]. 替换过程可能经历3个阶段: 弗兰克氏菌作为主共生微生物、根瘤菌作为次共生微生物, 共同侵染根瘤; 根瘤菌逐步替代弗兰克氏菌; 根瘤菌最终成为

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

唯一的共生微生物[23]. 支持该假说的证据如下:

(ⅰ) 无需依赖高度假设的“结瘤易感性”状态. 假设存在一个共同的结瘤固氮祖先, 可以很好地解释为什么所有结瘤物种都出现在一个进化支系中, 从而无需“结瘤易感性”的推测[11]. (ⅱ) 共生关键基因跨谱系功能保守. 如果根瘤起源于一次性获得, 则结瘤相关基因在不同谱系中应为直系同源[29]. 例如, 在豆科植物中, *NIN*转录因子的表达是根瘤器官发生的关键[32~34]. 该基因在木麻黄科(木麻黄, *Casuarina glauca*)及野麻科(北美假大麻, *Datisca glomerata*)的根瘤发生中同样起着至关重要的作用[35,36]. (ⅲ) 关键共生基因的丢失/假基因化与根瘤丧失同步. 在非结瘤植物中, 结瘤至关重要的基因(*NFP*/*NFR5*, *RPG*和*NIN*)丧失或假基因化[10]. 例如, 对山黄麻属植物与其非结瘤近缘种Trema的基因组比较发现, *NFP*/*NFR5*, *RPG*和*NIN*在Trema及其他非结瘤蔷薇目物种中已丧失或假基因化[5]. 更大范围的系统发育分析亦证明*NIN*与*RPG*的系统性缺失与根瘤性状的丧失高度一致[37]. (ⅳ) 远缘植物根瘤结构发育呈现趋同. 山黄麻属与部分豆科植物均在“固定线”容纳根瘤菌, 该结构高度类似于弗兰克氏菌侵染所形成的根瘤组织[38]. 此外, 一些放线菌结瘤植物, 如糙叶山黄麻(*Parasponia andersonii*)和欧洲桤木(*Alnus glutinosa*), 其根瘤结构具有与豆科植物根瘤更为接近的命运图谱[39]. 两类植物均由原始根皮层细胞, 特异性地形成感染组织且这些细胞通过有丝分裂激活参与根瘤构建[40]. (ⅴ) 共生微生物替代与大气CO_2浓度下降证据的支持. 在豆科及其他固氮植物中, 根瘤常被结瘤性根瘤菌与非结瘤性共生菌共同侵染, 这为微生物替代提供现实与免疫层面的证据[41]. 同时, 多次全球气候波动伴随的大气CO_2浓度下降削弱光合作用与碳水供给, 使结瘤成为代谢负担并在进化中遭受负向选择, 最终导致其在多个谱系中广泛丧失[11,42~45](图3).

结瘤单次获得假说认为, 根瘤出现在NFNC最近共同祖先中[11]. NFNC四个目的分化发生在NFNC与其姊妹类群分化后约104百万年, 由于分化的时间窗口仅有百万年, 意味着结瘤器官的进化需要在极短时间内完成. 另一种可能是, 固氮共生结瘤比先前认为的更加古老[46,47]. 尽管该假说能解释根瘤的镶嵌式分布, 并得到分子证据的支持, 但它无法很好解释豆科植物类型根瘤和放线菌植物类型根瘤在发生机制上的根本差异.

2　根瘤发生的进化创新与假说支撑

无论“根瘤多次获得”还是“根瘤单次获得”假说, 如果成立的话, 共生根瘤的进化都需要一系列关键的分子创新事件作为前提. 这些进化创新不仅决定根瘤共生是否可能发生, 也为检验不同假说提供重要的分子进化与功能验证的证据. 以下5项分子与机制上的创新起到了核心作用(图3).

(ⅰ) 宿主植物免疫抑制机制启动. 在豆科植物与根瘤菌的共生固氮系统中, 宿主需容忍根瘤菌在根瘤细胞内的大规模定殖[48], 因此在共生早期及维持阶段, 免疫抑制必不可少. 研究已鉴定出一系列调控根瘤菌在植物细胞内维持的关键因子. 例如, NAD1(nodules with activated fefense 1)是一种在固氮结瘤类群中保守存在的蛋白, 其突变体表现出根瘤坏死及类菌体定殖能力下降, 表明NAD1是一种早期被招募的免疫抑制因子[49]. 最近, 在蒺藜苜蓿中鉴定出细胞质激酶MtLICK1/2, 其与结瘤因子受体MtLYK3相互作用以驱动共生信号传导并抑制植物免疫[50]. 这些因子共同参与调控共生细胞中免疫反应的抑制, 防止植物对定殖细菌产生防御响应[51].

(ⅱ) *PACE*获得. *PACE*是一种存在于*NIN*启动子中的顺式调控元件, 仅在NFNC成员中发现[52]. 研究表明, *PACE*在根瘤发育初期于皮层细胞中诱导*NIN*表达, 促使这些细胞形成侵染线. *PACE*被认为是根瘤共生进化中的关键创新, 它将*NIN*的调控与已有的AM真菌共生信号通路连接起来, 从而使细菌能够通过侵染线等结构实现胞内侵染[12]. 同时, 多个谱系中*PACE*的独立丧失与根瘤共生能力的丧失高度一致, 强调了该元件在共生根瘤获得与丧失过程中的核心地位[52].

(ⅲ) *NIN*基因结瘤功能化. *NIN*基因在根瘤共生固氮的多个环节中发挥核心作用, 是豆科植物与根瘤菌共生研究中最广泛关注的调控因子之一[53]. 当前研究普遍认为, *NIN*的结瘤功能源自*NLP*(NIN-like protein)基因的进化. 功能分化的一个重要方面是对硝酸盐信号的响应差异, *NIN*和*NLP*分别在低氮和高氮环境中调控结瘤, 从而实现环境依赖的调控机制[54]. 此外, *NIN*的结瘤特异性还依赖于其结合启动子顺式调控元件的能力, 该调控特性可能源于启动子序列的新获得或*NIN*蛋白关键位点的氨基酸替代[32,52,53].

(ⅳ) SHR-SCR共生干细胞模块招募. SHORT-

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

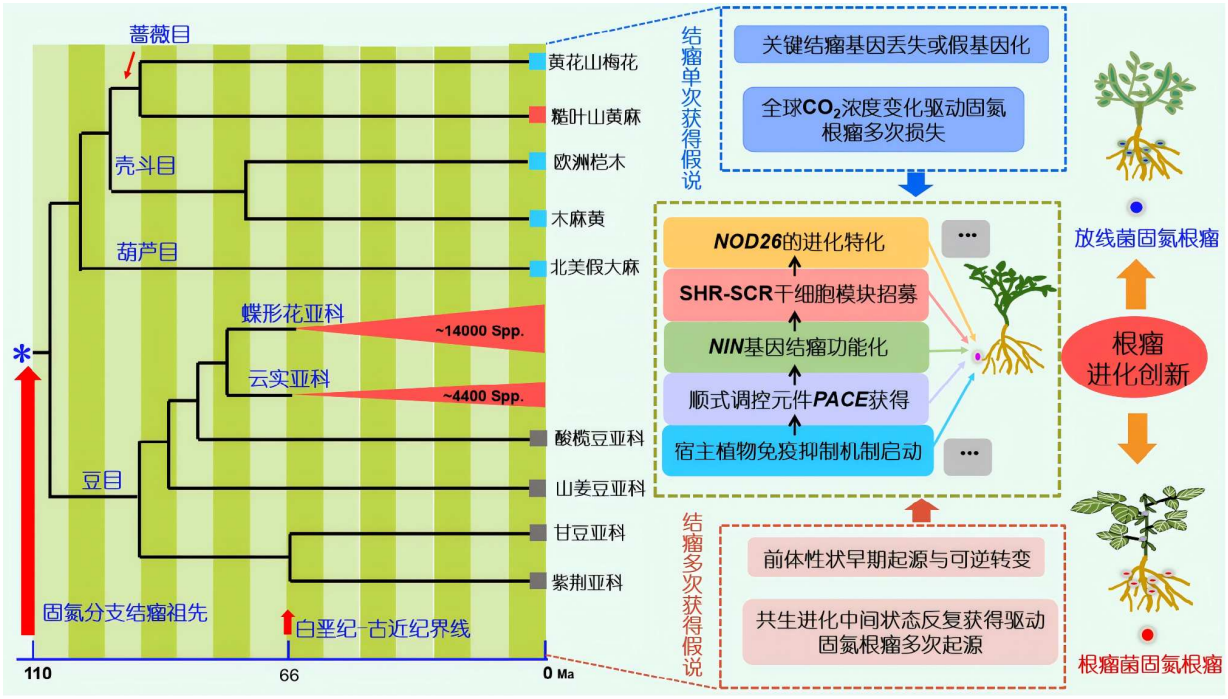


图 3 不同竞争假说的核心要点与根瘤发生进化创新
Figure 3 Core concepts of different competition hypotheses and evolutionary innovations in nodule formation

ROOT-SCARECROW(SHR-SCR)共生干细胞模块控制根皮层细胞的分裂潜能，在根瘤器官发生中发挥核心作用[55]. 在蒺藜苜蓿中，*MtSHR*与*MtSCR*在皮层中表达，这一模式与拟南芥中SHR-SCR在中柱或内皮的定位不同. *MtSCR*启动子中AT-1 box与增强子在豆科中高度保守，遗传学与分子实验证实*MtSHR*激活*MtSCR*，驱动皮层细胞分裂并启动根瘤器官发生. 同时，*LBD16*等侧根模块被协同招募，共同奠定根瘤形成的遗传基础[56,57].

(V) NOD26的进化特化. 氨是根瘤菌固定氮的主要释放形式，其有效转运对宿主植物的氮利用至关重要. 在被感染的根细胞中，类菌体被源自植物质膜的共生体膜包裹，并依赖膜上的特定通道调控代谢物交换. 在大豆等豆科植物中，NOD26是根瘤共生体膜的主要蛋白成分，表现为根瘤特异性高丰度表达，可高效介导氨从类菌体向宿主胞质的转运[58,59]. 系统发育与基因组学分析表明，NOD26属于被子植物特有的水通道蛋白亚群，在固氮类群中广泛存在，并在豆科中经历多次拷贝扩增；而在部分非豆科类群中则呈现低拷贝数甚至缺失，这与固氮共生能力的保留或丧失呈一定关联. 结合基因表达与代谢重建结果，NOD26的保留与扩增不仅支持高效氨转运，也可能在厌氧胁迫下通过氨解毒缓解能量危机，从而为固氮共生的出现提供关键的生理支撑[60]. NOD26的进化特化，而非氨转运本身，代表了被子植物固氮共生演化过程中的重要分子创新.

上述创新的建立和稳定，依赖于植物与微生物之间长期协同进化所形成的保守遗传机制. 植物与AM真菌共生关系的建立，是共生进化中的关键步骤，也是后续多种细胞内共生的前提(图3)[61,62]. 已有研究证明GRAS(GAI-RGA-SCR)家族转录因子RAD1(required for arbuscular development 1)以及两种“半型ATP结合盒转运蛋白”STR(stunted arbuscule)和STR2与AM共生密切相关，这说明RAD1，STR和STR2可能已在所有陆生植物的共同祖先中出现[63]. 其中，STR与STR2被证实直接参与脂质从宿主植物到AM真菌的转运，表明脂质的共生转运机制在AM共生的保守性中发挥核心作用. 当AM共生建立之后，其他类型的细胞内共生也陆续进化而来，例如杜鹃菌根、兰科菌根和固氮根瘤共生[64,65]. 过去普遍认为，不同植物类群中细胞内共生的遗传进化路径存在显著差异. 然而，当前研究发现，只有具备形成细胞内共生能力的植物才保留*LIN*

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

或*LIN*-like，*SYN*与*VPY*3个关键基因，表明各种细胞内共生关系可能源于一套保守的遗传程序[63]. CSSP与细胞内共生关系具有共同进化的历史，从早期的AM共生延伸至后来的杜鹃菌根、兰科菌根以及根瘤共生固氮系统. 这些共生关系的进化不仅依赖于对CSSP通路的持续招募，还需要植物与微生物之间在信号识别、营养交换与细胞结构重塑等方面的多重协同进化(图2)[30]. 在这套严密的保守遗传机制基础上, 植物才能持续招募新模块, 推动固氮根瘤等复杂共生系统的形成.

3　总结与展望

根瘤的进化涉及将多种不同基因调控模块整合为一套相互关联的共生性状体系，而追溯其进化历程并区分“单次获得”与“多次获得”两大对立假说仍然面临巨大挑战. 目前，最广泛的建模研究支持多次获得假说[4]，而现有的实证数据则更偏向单次获得假说(图3)[11,66]. 若未来能够发现早于NFNC四个目分化的根瘤化石，将为单次获得假说提供决定性支持证据[11,67,68]，但迄今为止所发现的最早的“根瘤状”化石距今约84百万年且该年代早于所有结瘤谱系的冠群年龄[11,69]. 然而，共生固氮根瘤在形态上常与线虫根瘤、外生菌根结瘤难以区分，因此仍需要更多、更可靠的化石证据来确认结瘤是否具有更早的起源. 在化石识别中应综合显微结构、元素组成和矿化模式等分析手段，区分真正的固氮根瘤与其他相似结构. 与此同时, 在未获得细胞内共生体痕迹或血红蛋白残留等直接证据之前, 应对化石的共生属性保持谨慎与保守的解释态度.

系统发育祖先状态重建的研究虽使我们能够从模型层面洞见约1亿年前的根瘤状态, 但其稳定性仍有待进一步评估. 当前的推断依赖若干模型假设, 例如, 性状转变率在谱系间相对恒定、性状观测记录完整且无系统性偏误, 以及时间尺度校准点的可靠性等. 若这些前提条件未被满足, 可能影响结瘤性状获得的次数. 时间尺度的推断亦受分子钟模型和化石校准设定影响, 不同参数组合可能显著改变起源事件的时序与概率分布. 因此, 应通过多模型比较与灵敏度分析, 系统评估独立起源次数与结瘤丧失频率在不同假设条件下的稳定性, 从而提升推断结果的可靠性. 此外, 在评估假说时, 还需谨慎对待不同类型证据的局限性. 形态和解剖差异并非区分根瘤起源的确凿依据. 例如，马桑属(*Coriaria*)与假大麻属(*Datisca*)的根瘤在解剖结构上高度相似，但由于两者在进化上已有约8500万年的分歧，系统发育重建通常将其解释为结瘤性的独立起源[3,46]. 此外，在壳斗目中，尽管来自三个不同结瘤谱系的若干物种在系统发育树上的分布相当分散[11]，但它们却共享一种独特的根毛侵染方式，这一特征暗示它们可能继承自共同祖先. 因此，未来的研究不能仅凭外在形态差异判断根瘤的起源，而需依托多重证据的交叉验证与深入分析加以阐明.

基于化石、分子以及先进人工智能等手段，未来应加强以下几个方面的研究: (ⅰ) 化石证据与古基因组分析. 系统开展潜在根瘤化石的采集与鉴定, 重点锁定中生代至古新世的关键地层，以期获取确定的结瘤最小年龄证据. 借助古基因组学追溯结瘤相关基因的演化历史，揭示基因丧失、复制与功能转化事件，为单次或多次起源假说提供独立分子证据. (ⅱ) 结瘤基因功能与调控机制解析. 在非结瘤植物中验证关键基因(如*NIN*)的功能与调控作用，明确哪些基因具备“前体性状”的潜能[8]. 虽然近年来已有研究尝试在单细胞水平开展探索, 但整体而言, 相关工作仍主要停留在组织整体层面的分析. 未来亟需加强单细胞组学与表观遗传学研究，以深入揭示根瘤发育过程中的细胞层级调控网络，从而突破现有研究瓶颈. (ⅲ) 假说检验与综合证据链构建. 以生物人工智能驱动数据融合与模型推断，将假说检验与功能基因研究、系统发育建模及化石证据协同起来，构建跨尺度的综合证据链条. 在此过程中，应避免对单一研究结果的过度依赖，而是综合多重证据来源，以增强假说检验的可靠性与可证性. (ⅳ) 工程化改造与作物应用路径. 在主粮作物中直接重建完整的固氮根瘤系统仍面临诸多挑战，包括固氮反应对能量与氧调控的高需求、宿主基因调控网络的不兼容性, 以及稳定表达体系的缺乏等. 这些瓶颈使短期内实现完整根瘤系统的重建难度极大. 因此, 更现实的策略是采用模块化、渐进式的工程化路径. 首先在模式植物中重构信号识别与感染结构形成的核心模块，然后逐步将单个功能模块导入水稻、玉米等谷类作物, 建立可控的“过渡型”共生体系. 目前，分阶段遗传改造的路线图已被提出[70,71]，依次实现从根毛识别、信号转导到感染结构与固氮维持的模块化构建. 例如，可在主粮作物中导入结瘤因子感知模块(MtNFP-ZmMYR1和MtLYK3-ZmCERK1)，评估其对

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

结瘤信号的响应与生长表现. 与此同时, 还可探索工程化改造的替代方案, 如构建可容纳弗兰克氏菌共生的“简化版”根瘤系统[72,73]或利用蓝藻胞外共生体为非豆科谷类作物提供过渡性的固氮支持[72]. 最近, 一项研究通过改变植物受体激酶局部残基从而实现功能化的分子机制, 这种最小残基重编程策略亦为非固氮植物的改造提供了新的思路[74].

总体而言, 针对NFNC类群中共生根瘤的遗传与进化研究正迅速发展, 扩大物种采样范围将有助于推动相关问题的解析[75]. 若要检验根瘤起源假说, 理解非结瘤植物中结瘤基因的功能与调控机制尤为关键[32]. 此外, 厘清这些基因的表达调控与根瘤同源性之间的关系[76], 对于根瘤共生的基础性理解及其在作物工程中的应用均具有深远意义. 随着单细胞组学、系统发生学、精准快速基因编辑以及生物人工智能等科学技术的不断发展和综合应用, 该领域有望在验证根瘤起源假说与推动作物固氮改良两个层面上实现实质性飞跃.

参考文献

1 Delaux P M, Radhakrishnan G, Oldroyd G. Tracing the evolutionary path to nitrogen-fixing crops. Curr Opin Plant Biol, 2015, 26: 95–99

2 Doyle J J. Chasing unicorns: nodulation origins and the paradox of novelty. Am J Bot, 2016, 103: 1865–1868

3 Svistoonoff S, Hocher V, Gherbi H. Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation? Curr Opin Plant Biol, 2014, 20: 11–18

4 Kates H R, O’Meara B C, LaFrance R, et al. Shifts in evolutionary lability underlie independent gains and losses of root-nodule symbiosis in a single clade of plants. Nat Commun, 2024, 15: 4262

5 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

6 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

7 Gao Y Z, Ren J. Advances and prospects in plant root nodule symbiotic nitrogen fixation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 131–145 [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]

8 Doyle J J, Ren J, Pawlowski K, et al. One versus many independent assemblies of symbiotic nitrogen fixation in flowering plants. Nat Commun, 2025, 16: 5345

9 Hughes C, Ringelberg J J, Bruneau A. Legumes. Curr Biol, 2025, 35: R323–R328

10 Griesmann M, Chang Y, Liu X, et al. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. Science, 2018, 361: eaat1743

11 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

12 Parniske M. Uptake of bacteria into living plant cells, the unifying and distinct feature of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis. Curr Opin Plant Biol, 2018, 44: 164–174

13 Werner G D A, Cornwell W K, Sprent J I, et al. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N_2-fixation in angiosperms. Nat Commun, 2014, 5: 4087

14 Battenberg K, Potter D, Tabuloc C A, et al. Comparative transcriptomic analysis of two actinorhizal plants and the legume medicagotruncatula supports the homology of root nodule symbioses and is congruent with a two-step process of evolution in the nitrogen-fixing clade of angiosperms. Front Plant Sci, 2018, 9: 1256

15 Beaulieu J M, O’Meara B C, Donoghue M J. Identifying hidden rate changes in the evolution of a binary morphological character: the evolution of plant habit in campanulid angiosperms. Systatic Biol, 2013, 62: 725–737

16 Boyko J D, Beaulieu J M, Cooper N. Generalized hidden Markov models for phylogenetic comparative datasets. Methods Ecol Evol, 2021, 12: 468–478

17 Ferguson B J, Mens C, Hastwell A H, et al. Legume nodulation: the host controls the party. Plant Cell Environ, 2019, 42: 41–51

18 Ardley J, Sprent J, van der Heijden M. Evolution and biogeography of actinorhizal plants and legumes: a comparison. J Ecol, 2021, 109: 1098–

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

1121
19 Udvardi M, Poole P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. Annu Rev Plant Biol, 2013, 64: 781–805
20 Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, et al. The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. Mol Plant Microbe Interact, 2010, 23: 593–607
21 Downie J A. Legume nodulation. Curr Biol, 2014, 24: R184–R190
22 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]
23 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
24 Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, et al. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 4928–4932
25 Markmann K, Giczey G, Parniske M, et al. Functional adaptation of a plant receptor- kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. PLoS Biol, 2008, 6: e68
26 Svistoonoff S, Benabdoun F M, Nambiar-Veetil M, et al. The independent acquisition of plant root nitrogen-fixing symbiosis in fabids recruited the same genetic pathway for nodule organogenesis. PLoS One, 2013, 8: e64515
27 Sprent J I, Ardley J, James E K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. New Phytol, 2017, 215: 40–56
28 Santi C, Bogusz D, Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot, 2013, 111: 743–767
29 Doyle J J. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. Annu Rev Ecol Evol S, 1994, 25: 325–349
30 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
31 Wu Z, Wang M, Yang S, et al. A global coexpression network of soybean genes gives insights into the evolution of nodulation in nonlegumes and legumes. New Phytol, 2019, 223: 2104–2119
32 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
33 Liu C W, Breakspear A, Guan D, et al. NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. Plant Physiol, 2019, 179: 1704–1722
34 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
35 Clavijo F, Diedhiou I, Vaissayre V, et al. The *Casuarina NIN* gene is transcriptionally activated throughout *Frankia* root infection as well as in response to bacterial diffusible signals. New Phytol, 2015, 208: 887–903
36 Demina I V, Persson T, Santos P, et al. Comparison of the nodule *vs*. root transcriptome of the actinorhizal plant *Datisca glomerata*: actinorhizal nodules contain a specific class of defensins. PLoS One, 2013, 8: e72442
37 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
38 Liang Y, Cao Y, Tanaka K, et al. Nonlegumes respond to rhizobial nod factors by suppressing the innate immune response. Science, 2013, 341: 1384–1387
39 Shen D, Xiao T T, van Velzen R, et al. A homeotic mutation changes legume nodule ontogeny into actinorhizal-type ontogeny. Plant Cell, 2020, 32: 1868–1885
40 Xiao T T, Schilderink S, Moling S, et al. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. Development, 2014, 141: 3517–3528
41 Martínez-Hidalgo P, Hirsch A M. The nodule microbiome: N_2-fixing rhizobia do not live alone. Phytobiomes J, 2017, 1: 70–82
42 Zhang Y G, Pagani M, Liu Z, et al. A 40-million-year history of atmospheric CO_2. Phil Trans R Soc A, 2013, 371: 20130096
43 Gulbranson E L, Jacobs B F, Hockaday W C, et al. Nitrogen-fixing symbiosis inferred from stable isotope analysis of fossil tree rings from the Oligocene of Ethiopia. Geology, 2017, 45: 687–690
44 Taylor B N, Menge D N L. Light regulates tropical symbiotic nitrogen fixation more strongly than soil nitrogen. Nat Plants, 2018, 4: 655–661
45 Chen H, Markham J. Ancient CO_2 levels favor nitrogen fixing plants over a broader range of soil N compared to present. Sci Rep, 2021, 11: 3038
46 Li H L, Wang W, Mortimer P E, et al. Large-scale phylogenetic analyses reveal multiple gains of actinorhizal nitrogen-fixing symbioses in angiosperms associated with climate change. Sci Rep, 2015, 5: 14023

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

47 Wang H, Moore M J, Soltis P S, et al. Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 3853–3858
48 Domonkos Á, Kovács S, Gombár A, et al. NAD1 controls defense-like responses in *Medicago truncatula* symbiotic nitrogen fixing nodules following rhizobial colonization in a BacA-independent manner. Genes, 2017, 8: 387
49 Wang C, Yu H, Luo L, et al. *NODULES WITH ACTIVATED DEFENSE 1* is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. New Phytol, 2016, 212: 176–191
50 Wang D, Jin R, Shi X, et al. A kinase mediator of rhizobial symbiosis and immunity in *Medicago*. Nature, 2025, 643: 768–775
51 Berrabah F, Ratet P, Gourion B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. J Exp Bot, 2015, 66: 1977–1985
52 Cathebras C, Gong X, Andrade R E, et al. A novel *cis*-element enabled bacterial uptake by plant cells. BioRxiv, 2022, 2022: 486070
53 Shen L, Feng J. NIN—at the heart of NItrogen-fixing Nodule symbiosis. Front Plant Sci, 2024, 14: 1284720
54 Yan D, Nambara E. Conserved and unique functions of NIN-like proteins in nitrate sensing and signaling. Plant Sci, 2023, 336: 111842
55 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
56 Soyano T, Liu M, Kawaguchi M, et al. Leguminous nodule symbiosis involves recruitment of factors contributing to lateral root development. Curr Opin Plant Biol, 2021, 59: 102000
57 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
58 Fortin M G, Morrison N A, Verma D P S. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 813–824
59 Hwang J H, Ellingson S R, Roberts D M. Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel. FEBS Lett, 2010, 584: 4339–4343
60 Frare R, Ayub N, Alleva K, et al. The ammonium channel NOD26 is the evolutionary innovation that drives the emergence, consolidation, and dissemination of nitrogen-fixing symbiosis in angiosperms. J Mol Evol, 2018, 86: 554–565
61 Wang D, Dong W, Murray J, et al. Innovation and appropriation in mycorrhizal and rhizobial Symbioses. Plant Cell, 2022, 34: 1573–1599
62 Rimington W R, Duckett J G, Field K J, et al. The distribution and evolution of fungal symbioses in ancient lineages of land plants. Mycorrhiza, 2020, 30: 23–49
63 Radhakrishnan G V, Keller J, Rich M K, et al. An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. Nat Plants, 2020, 6: 280–289
64 Dickie I A, Alexander I, Lennon S, et al. Evolving insights to understanding mycorrhizas. New Phytol, 2015, 205: 1369–1374
65 Genre A, Lanfranco L, Perotto S, et al. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. Nat Rev Microbiol, 2020, 18: 649–660
66 Libourel C, Keller J, Brichet L, et al. Comparative phylotranscriptomics reveals ancestral and derived root nodule symbiosis programmes. Nat Plants, 2023, 9: 1067–1080
67 Hirsch A M, Larue T A, Doyle J. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ *sui generis*? Crit Rev Plant Sci, 1997, 16: 361–392
68 Battenberg K, Hayashi M. Evolution of root nodule symbiosis: focusing on the transcriptional regulation from the genomic point of view. Plant Biotechnol, 2022, 39: 79–83
69 Herendeen P S, Magallon-Puebla S, Lupia R, et al. A preliminary conspectus of the Allon flora from the Late Cretaceous (Late Santonian) of Central Georgia, U.S.A. Ann Missouri Botanical Garden, 1999, 86: 407
70 Guo K, Yang J, Yu N, et al. Biological nitrogen fixation in cereal crops: progress, strategies, and perspectives. Plant Commun, 2023, 4: 100499
71 Huisman R, Geurts R. A roadmap toward engineered nitrogen-fixing nodule symbiosis. Plant Commun, 2020, 1: 100019
72 Mathesius U. Humboldt review: are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. J Plant Physiol, 2022, 276: 153765
73 James E K. The seeds of nodulation. J Plant Physiol, 2022, 278: 153812
74 Tsitsikli M, Simonsen B, Luu T B, et al. Two residues reprogram immunity receptors for nitrogen-fixing symbiosis. Nature, 2025, 648: 443–450
75 James E K. Intimacy stabilizes symbiotic nodulation. Nat Plants, 2023, 9: 1008–1009
76 DiFrisco J, Wagner G P, Love A C. Reframing research on evolutionary novelty and co-option: character identity mechanisms versus deep homology. Semin Cell Dev Biol, 2023, 145: 3–12

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222

Advances and perspectives in the evolutionary hypothesis of root nodule symbiosis

REN Jian[1,2,3] & GAO YingZhi[1,3*]

[1] *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*
[2] *Institute of Agricultural Resources and Environments, Jilin Academy of Agricultural Sciences (Northeast Agricultural Research Center of China), Changchun 130033, China*
[3] *Key Laboratory of Vegetation Ecology of the Ministry of Education, Jilin Songnen Grassland Ecosystem National Observation and Research Station, Institute of Grassland Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China*
* *Corresponding author, E-mail: gaoyz108@nenu.edu.cn*

A subset of flowering plants has evolved the ability to associate with diazotrophic symbionts, converting atmospheric N_2 into bioavailable nitrogen for host nutrition. However, nodulation is restricted to species within the "nitrogen-fixing nodulation clade", scattered across several families in four plant orders. Two primary competing hypotheses currently exist for this patchy distribution: multiple independent gains versus a single gain. Through a systematic synthesis of validated evidence from the two competing hypotheses, we aim to reconstruct the evolutionary origins of root nodule symbiosis. Synthesis of molecular and phylogenetic data reveals that the evolution of root nodule symbiosis was enabled by five critical innovations, including suppression of host immune responses, acquisition of the *PACE*, neofunctionalization of the *NIN* gene, recruitment of the SHORTROOT-SCARECROW stem cell regulatory module, and evolutionary specialization of NOD26. Meanwhile, The genetic basis of intracellular symbiotic relationships is highly conserved, leading to evolutionary stability in symbiotic nodulation. The innovations at the molecular and developmental levels have provided evolutionary clues for the development of two hypotheses, offering new insights and understandings into the origin and evolution of nitrogen-fixing symbiotic root nodules.

root nodule, symbiotic nitrogen fixation, nitrogen-fixing nodulation clade, nitrogen-fixation evolution

doi: 10.1360/SSV-2025-0222

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0222