

周宇, 端木德强. 豆科植物固氮根瘤衰老过程中的代谢调控研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 12-24.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.003

豆科植物固氮根瘤衰老过程中的代谢调控研究进展

周宇¹, 端木德强²

1. 宿州学院生物与食品工程学院, 宿州 234000; 2. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室/
华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 衰老是影响豆科植物根瘤固氮效率的主要因素之一, 深入探究根瘤的衰老调控机制具有重要意义。本文从衰老根瘤的形态特征和生理生化变化、衰老的途径以及物质代谢调控等方面综述根瘤衰老的研究进展, 总结了豆科植物和根瘤菌中与衰老相关基因在共生固氮过程中的功能。开发新的研究方法和技术能够更全面地揭示衰老根瘤中关键物质代谢的分子机制。深入了解根瘤衰老的分子机制有助于通过遗传改造延缓根瘤衰老, 提高豆科植物的固氮效率, 促进农业生产的可持续发展。

关键词 共生固氮; 根瘤衰老; 环境胁迫; 转录调控; 物质代谢

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0012-13

当环境中可利用的氮元素有限时, 豆科植物能与土壤固氮细菌(称为根瘤菌)建立共生关系, 并形成专门的共生器官—根瘤(nodule)。在共生关系建立的起始阶段, 豆科植物根部分泌的类黄酮(flavonoid)物质能够刺激根瘤菌产生结瘤因子(nod factor), 特定的结瘤因子被植物的相应受体识别后激活下游的共生信号转导通路以帮助根瘤菌经由根毛形成的侵染线进入植物皮层细胞^[1-4]。根瘤菌进入宿主细胞之后分化为类菌体, 后者依赖固氮酶的活性将大气中的氮气(N_2)转化为植物可利用的 NH_3/NH_4^+ 。作为回报, 根瘤菌获得植物的光合碳同化产物。与此同时, 一系列与固氮相关基因受诱导上调表达以维持和调节在高效固氮过程中所需的低氧环境、氧化还原平衡、碳氮代谢平衡以及营养物质的运输^[2, 5]。

根瘤包括2种主要形态, 一种是定型根瘤, 如由大豆(*Glycine max*)和百脉根(*Lotus japonicus*)形成的根瘤, 根瘤呈球形, 原因是其分生组织不持久; 另一种是不定型根瘤, 如由蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)和豌豆(*Pisum sativum*)形成的根瘤。成熟的不定型根瘤呈棒状且包含4个不同的功能区域, 包括具有持续分裂能力的顶端分生组织区(meristem)、侵染区(infection zone)、固氮区(nitrogen fixation zone)

和衰老区(senescence zone)。在根瘤成熟阶段, 衰老区位于固氮区的近端, 随着根瘤的衰老, 衰老区逐渐由近端向远端扩散直至达到根瘤顶端^[2](图1)。乔木和灌木豆科植物能够形成木质化的多年生根瘤, 而1年生速生豆科植物的根瘤寿命则相对较短, 在3~5周时, 根瘤的固氮活力开始下降, 根瘤进入衰老阶段^[6]。

定型根瘤和不定型根瘤存在不同的衰老组织扩散模式。不定型根瘤包含1个在成熟根瘤中就开始形成的衰老区, 衰老区随着根瘤的生长而逐渐扩大, 直至延伸到整个根瘤^[7](图1)。而在定型根瘤中, 衰老区最早出现在侵染区的中心位置, 然后逐渐延伸并在几周后到达根瘤组织的边缘(图1)。与豆科植物-根瘤菌早期相互作用(如菌植互作、根瘤发育、成熟根瘤固氮)的研究相比, 学术界对根瘤衰老机制的研究相对较少。然而根瘤的完整生长周期和其固定氮的总量密切相关, 延迟根瘤衰老对于提高宿主植物的氮利用效率具有重要意义。

1 衰老根瘤的形态特征和生理生化变化

根瘤的衰老过程可以从颜色的变化来识别, 粉

收稿日期: 2024-06-03

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(2308085QC75)

周宇, E-mail: zhoyu@ahszu.edu.cn

通信作者: 端木德强, E-mail: duanmu@mail.hzau.edu.cn

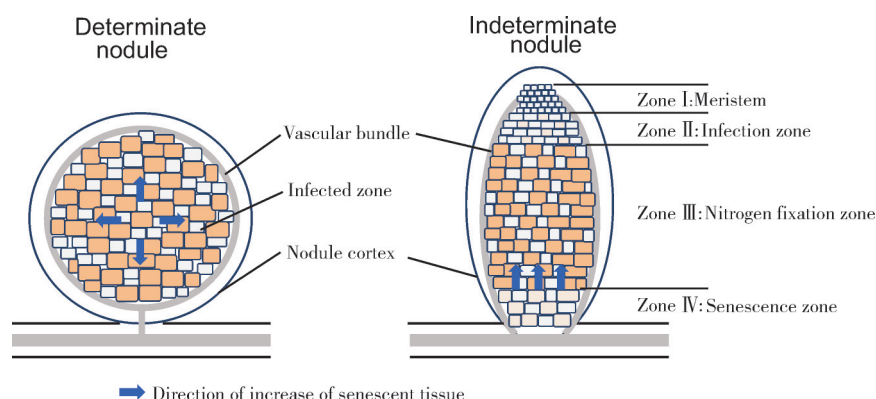


图1 定型和不定型根瘤结构示意图

Fig.1 Diagram of the structure of determinate and indeterminate nodule

红色的成熟固氮根瘤在衰老期转变为绿色根瘤(图2)。根瘤呈红色是因为豆血红蛋白(leghemoglobin, Lb)大量积累,一旦固氮酶受到抑制,植物Lb的表达水平就显著下降。衰老根瘤绿色的外观与绿色豆血红蛋白和胆绿素(biliverdin)的积累有关。在衰老的大豆根瘤中,Lb结合的血色素(heme)被硝基化修饰,其中活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)在这个反应过程中起到关键作用^[8]。血红素在氧气存在条件下被血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO1)分解生成胆绿素。百脉根 *hcl* 突变体的衰老绿色根瘤显著减少,根瘤中胆绿素含量显著降低^[9]。

根瘤衰老的组织在时间和空间上不是同步发生的。对大豆衰老根瘤超微结构的研究显示,衰老根瘤细胞质的电子密度逐渐降低,并出现大量囊泡^[6],此外,共生体的大小和形状会随着类菌体的降解而发生变化。同时,根瘤细胞器的组成和结构也会发生改变,根瘤细胞中的过氧化物酶体的数量增加,线粒体开始延伸和膨大,质体逐渐积累铁蛋白(ferritin)和淀粉颗粒^[10-11]。对大豆、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和羽扇豆(*Lupinus albus*)根瘤的生化和细胞学研究显示,共生体膜在根瘤衰老过程中可能最先被降解^[10]。在衰老的后期阶段,细胞中通常可以观察到大量淀粉颗粒、细胞壁断裂,细胞膜以及细胞质和线粒体内嵴消失,其他细胞器的完整形态也已经无法辨别^[7, 10]。共生体膜包裹着根瘤菌,形成一个特殊的内环境来支持固氮酶的功能,参与包括离子浓度的调节、pH的稳定和营养物质的运输等过程。Lb降解释放的铁会扰乱共生体膜的功能,使该膜的通透性遭到破坏^[12]。当共生体膜受到破坏时,这些内环境条件会发生变化,最终导致固氮酶的功能受到抑制。

根瘤进入衰老期之后的生理和形态特征进一步

改变,根瘤的代谢活动开始减弱,Lb的转录水平下降,包括固氮酶在内的多种酶催化活性也逐渐减弱^[6]。与此同时,活性氧化物、抗氧化剂、激素和转录因子也逐渐发挥它们对根瘤衰老的调控作用^[2, 6, 13]。随着共生体的裂解和宿主细胞成分的逐步分解,与蛋白质、核酸、膜脂和糖类降解途径相关基因的转录水平逐渐增高^[7],编码参与多种分子运输相关的蛋白,包括ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)和特异性的磷酸盐、氨基酸、金属离子转运体被诱导表达^[7],这表明部分营养物质在衰老根瘤中被分解、转运和循环利用。

2 豆科植物根瘤衰老的调控机制

2.1 胁迫诱导根瘤衰老

诱导根瘤衰老的因素有很多,除了开花、种子灌浆和落叶等自然因素^[6, 14]之外,硝酸盐、黑暗、干旱和盐胁迫等多种环境因子均可诱导根瘤衰老^[13, 15](图2)。黑暗胁迫和硝酸盐处理诱导根瘤中ROS水平增高^[9],而包括谷胱甘肽(glutathione, GSH)和抗坏血酸(ascorbic acid)在内的抗氧化物质在根瘤中大幅度减少^[16]。经过干旱处理的蒺藜苜蓿根瘤的蛋白酶活性和铁离子浓度显著升高^[17]。盐胁迫对豆科植物根瘤发育的各个阶段都产生不利影响,包括根瘤菌感染率降低、根瘤固氮活性被抑制以及加速根瘤早衰^[18-19]。盐胁迫可能通过直接或间接影响固氮酶活性、Lb含量、呼吸速率和光合产物的利用效率来抑制根瘤中氮的固定^[18]。另外,高温、酸性土壤条件和根部病原菌感染也会破坏共生关系从而导致根瘤早衰^[6]。

2.2 激素信号途径调控根瘤衰老

激素调控着共生固氮的所有环节,包括根瘤菌的侵染以及根瘤的起始、根瘤数、发育和衰老。脱落

酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)对根瘤的衰老起着正调控作用(图2)。ABA在协调衰老过程中起着主要作用,随着根瘤衰老,抗坏血酸水平下降,根瘤组织中的碳氮比增加会促进ABA合成及其转导途径的激活,其后活性上升的蛋白酶和蛋白酶体加速根瘤衰老的进程^[6]。但是, Van de velde等^[7]的研究表明,ABA的响应基因在苜蓿衰老区中的转录没有明显的变化。S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAM synthetase)、氨基乙酸合成酶(ACC synthase)和氨基乙酸氧化酶(ACC oxidase)等与乙烯合成相关的基因在衰老的根瘤中表达上调^[20-21]。乙烯生物合成和信号影响共生体中的类菌体数量、伸长、释放和衰老^[21]。JA调节植物的发育以及生物和非生物胁迫响应^[22]。氧化烯环化酶(allene oxide cyclase)是JA合成的关键酶,定位在根瘤非侵染细胞的质体^[23],因此推测JA的合成仅限定在该类型的细胞中。相反,赤霉素(gibberellic acid, GA)对根瘤的衰老起着负调控的作用^[24]。在豌豆共生根瘤衰老过程中,与GA合成相关基因GA 20-oxidase 1和降解相关的基因GA 2-oxidase 1的表达量分别下降和上升,从而导致细胞中GA水平降低。外源GA3处理能够下调与衰老相关基因的表达、减小根瘤衰老区的面积以及延缓根瘤的衰老进程^[24]。独脚金内酯(strigolactone, SL)是一种新发现的激素^[25],但是对于它如何参与共生固氮的调控还不清楚。利用SL类似物处理紫花苜蓿导致植株的根瘤数量增加,但是根瘤菌的生长和结瘤因子的合成不受影响^[26]。在豌豆、蒺藜苜蓿和百脉根中沉默或敲除SL的合成基因,突变体植株的根瘤数量减少,但是根瘤的发育和形态不受影响^[27-29]。最新结果表明,SL在豌豆中通过调控糖的水平来影响根瘤衰老^[30]。

2.3 一氧化氮信号途径调控根瘤衰老

一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种具有自由基性质的生物活性分子,在植物中广泛参与生长发育、对病原体的响应和防御等过程。越来越多的研究表明,NO在豆科植物与根瘤菌互作的不同阶段(如识别、侵染、根瘤发育和衰老)发挥着不同的作用^[31-33]。NO可以诱导编码固氮酶的基因的表达,但是也有研究证明NO能够抑制固氮酶活性,诱导根瘤的衰老(图2)。利用特异的荧光探针检测发现,NO在衰老的大豆^[34]和蒺藜苜蓿^[35]的根瘤中积累。在黑暗胁迫条件下,降低NO浓度可以延缓根瘤的衰老,而增加内源性NO会导致根瘤结构的细胞学变化

和早期衰老标记基因的表达^[35]。同时,根瘤菌可以通过NO介导的豆科植物蛋白质的翻译后修饰来调节根瘤衰老^[36-37]。在成熟的根瘤中NO代谢更加活跃,植物和根瘤菌都参与了NO的产生和清除。非共生I类血红蛋白LjGlb1-1可以负调控NO水平,增强成熟和衰老根瘤的固氮酶活性,并延缓根瘤衰老^[34]。中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)Hmp基因编码1个黄素血红蛋白(flavohemoglobin),该蛋白具有NO解毒酶的功能,能够抑制根瘤菌的NO水平并延缓根瘤衰老^[38]。利用hmp突变菌株接种苜蓿时,根瘤固氮的效率降低^[35]。在共生固氮过程中,NO还可能通过与其他信号途径互作共同调控根瘤的生长和发育^[33]。

2.4 转录调控因子调控蛋白酶表达激活根瘤衰老

对根瘤转录组学的研究表明,根瘤的衰老受到植物严密的转录调控^[7, 39]。最近,多项研究表明NAC类转录因子在根瘤的衰老过程中发挥重要作用(图2)。大豆NAC转录因子SNAP1/2/3/4和百脉根LjNAC094被证明是在成熟根瘤中介导对环境硝酸盐反应的关键因子, snap1/2/3/4四重突变体和 nac094 突变体根瘤对高浓度硝酸盐的敏感性降低^[40-41],因此,NAC转录因子可以通过氮代谢途径参与调控根瘤的衰老。大豆GmNAC181和苜蓿MtNAC969参与根瘤对盐胁迫的响应^[42-43]。Wang等^[42]研究证明,GmNAC181通过直接调控GmNINa促进共生结瘤以及增强根瘤的耐盐性,而MtNAC969在根部的非生物胁迫响应和根瘤衰老中扮演重要角色^[43]。GmNAC039、GmNAC018、LjNAC094以及bHLH(basic helix-loop-helix transcription factor)家族转录因子MtbHLH2被证明通过激活半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteases, CP)基因的表达来调控根瘤的衰老^[40, 44-45],因此正调控根瘤衰老的转录组因子可能普遍通过激活蛋白酶表达来促进根瘤衰老。

蛋白酶在植物中具有多种生理功能,包括降解其他蛋白质、调控细胞死亡、响应环境胁迫等。在根瘤衰老的过程中,包括CP和天冬氨酸蛋白酶(aspartic peptidase)在内的多种蛋白酶被激活^[46-49](图2),这些酶的表达导致包括Lb在内的大量蛋白质降解,从而促进根瘤的衰老。苜蓿半胱氨酸蛋白酶基因MtCP6、MtVPE和MtCP77在自然衰老的根瘤或胁迫诱导的根瘤中被检测到上调表达^[44]。从豌豆根瘤中鉴定得到了2个半胱氨酸蛋白酶基因Cyp15a和

PsCyp1。 *Cyp15a* 在根瘤顶端分生区表达强烈, 而 *PsCyp1* 在根瘤衰老的侵染组织中表达^[50]。 *GmCYP37*、*GmCYP35*、*GmCYP39* 和 *GmCYP45* 转录水平的增高能够显著地抑制大豆根瘤的固氮酶活性^[45]。 分别在大豆、蒺藜苜蓿以及紫云英(*Astragalus sinicus*)中抑制 *CP* 基因的表达均能够延缓根瘤的

衰老和延长根瘤的寿命^[45, 51]。 百脉根天冬氨酸蛋白酶 APN1 能够特异性地水解根瘤菌的自转运蛋白 DCA1, 该基因突变体在共生条件下表现为根瘤早衰^[52-53]。 在蒺藜苜蓿中沉默丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *MtSer6* 则导致根瘤中 Lb 含量的下降和铁离子水平的增高。

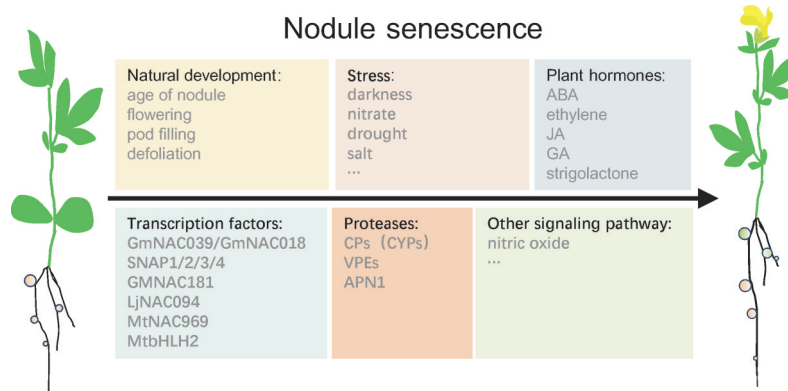


图2 豆科植物根瘤衰老机制的模式图

Fig. 2 Diagram of the aging mechanism in legume nodules

2.5 共生固氮关键基因的缺失诱导根瘤衰老

在百脉根和苜蓿中多个共生固氮关键基因的缺失突变体都表现为根瘤早衰的表型, 例如 *apn1*^[53]、*fen1*^[54]、*sen1*^[55]、*ern2*^[56]、*sst1*^[57]、*lb123*^[58], 这些基因广泛参与了共生信号的传递、营养物质的运输以及根瘤高效固氮的维持。根瘤菌编码的固氮相关基因的突变同样会导致根瘤提前衰老。在固氮根瘤中, *FixL*/*FixJ* 组成的双组分系统通过感知氧气浓度来调节 *fix* 和 *nif* 基因的表达。 *fixJ*、*fixA*、*nifD* 和 *nifH* 突变体接种植物后, 根瘤中类菌体降解并表现出早衰表型^[59-61]。此外, 根瘤菌的支链氨基酸(*Aap* 和 *Bra*)和二羧酸盐(*DctA*)转运蛋白基因的突变也会导致根瘤提前衰老。因此, 无论是宿主植物还是根瘤菌的共生基因缺陷导致的固氮酶活性下降和缺失均有可能诱导根瘤早衰。

豆科植物与根瘤菌的相互作用是高耗能过程, 宿主可以通过激活衰老来严格控制功能失调的根瘤。通过研究特定衰老基因的作用和调控机制, 鉴定延缓根瘤衰老的可能途径, 有助于延长根瘤的寿命并提高豆科植物的共生固氮能力。根瘤的衰老由宿主植物和根瘤菌共同调节, 一系列细胞代谢过程和营养物质运输在衰老的进程中也发生了变化。

3 衰老根瘤中的物质代谢调控

3.1 衰老根瘤的碳代谢调控

尽管根瘤仅占植物生物量的很小一部分, 但是

共生固氮作用可以消耗多达 25% 的光合作用产物^[62], 根瘤从植物获得的最主要光合作用产物是蔗糖^[63](图3)。组织特异性转录组分析表明, 参与调控蔗糖分解的基因在根瘤中上调表达^[64]。蔗糖可以通过蔗糖合酶(sucrose synthase)水解产生 UDP-葡萄糖和果糖, 或者通过碱性转化酶(alkaline invertase)产生葡萄糖和果糖。豌豆中的蔗糖合酶基因突变体 *rug4* 因缺乏固氮酶活性, 无法生长出有固氮能力的根瘤^[65]。在百脉根根瘤中, 蔗糖合酶和碱性/中性转化酶 *LjInv1* 的转录水平和酶活性在细胞中都有所升高^[66]。nodulin-100 是蔗糖合酶的亚基, 其活性受到游离血红素的调节^[67], 因此, 当根瘤衰老时, 由血红素结合蛋白降解释放的游离血红素可能影响蔗糖合酶的结构和活性, 从而影响根瘤整体的碳代谢。蔗糖的水解产物用于纤维素和淀粉的合成; 另外, 可以通过糖酵解代谢产生磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP), PEP 再经过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEP carboxylase, PEPC)和苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenases, MDH)的催化生成苹果酸(malate), 苹果酸运输到类菌体中为固氮提供能量来源^[63, 68](图3)。当大豆根瘤中能量上升时, 线粒体蛋白 GmNAS1 (nodule AMP sensor 1) 和 GmNAP1 (NAS1-associated protein 1) 形成的二聚体通过调节 GmNFYC10a 在细胞核中的积累, 调控相关基因表达从而调节 PEP 分配以促进类菌体的氮固定^[69], 通

通过对PEP的再分配将固氮速率与根瘤的能量状态联系起来。豆科植物特有的SnRK1 α 4(sucrose nonfermenting1-related protein kinase 1)对根瘤固氮具有正调控作用。研究发现,DMI2(does not make infection 2)能够磷酸化SnRK1 α 4,激活后的SnRK1 α 4再磷酸化MDH,促进细胞质中苹果酸的生成。因此,根瘤通过DMI2-SnRK1 α 4-MDH途径促进细胞质中苹果酸的产生,从而为类菌体提供碳源^[70]。

植物宿主和根瘤菌之间存在紧密的营养共享关系。这种关系在维持根瘤的功能和共生固氮过程中发挥重要作用。然而,在衰老期间,这种共享关系可能会受到影响。硝酸盐和黑暗处理会导致根瘤中葡萄糖、蔗糖和淀粉含量快速下降^[16]。蔗糖和己糖代谢的酶在有效和无效根瘤中的活性存在显著差异。在黑暗诱导的衰老过程中,蔗糖合酶的活性被抑制,影响了根瘤对蔗糖和己糖的利用^[71]。在胁迫条件(如盐胁迫或感染害虫)下,蔗糖合酶基因的突变导致根瘤早衰,这种早衰与碳代谢途径酶的活性变化尤其是蔗糖合酶和己糖代谢酶有关^[16, 71]。MtATB2编码bZIP转录因子,被证明受蔗糖调节并在根瘤衰老过程中上调表达^[72],推测它在衰老的根瘤中维持蔗糖的稳态。

3.2 衰老根瘤的氮代谢调控

根瘤中的碳和氮代谢途径相互关联。碳代谢途径为根瘤提供能量和碳骨架,以支持共生固氮和氮同化^[73]。N₂进入根瘤菌并通过固氮酶还原为氨。氨(或铵离子)穿过共生体膜后被输送至细胞质中,通过谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(glutamine synthetase/glutamate synthase, GS/GOGAT)转化为谷氨酰胺^[74](图3)。在大豆、菜豆等豆科作物中,谷氨酰胺可以进入嘌呤合成通路合成黄嘌呤(xanthine),然后再在黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase)和尿酸酶(uricase)的连续催化作用下进一步转化为酰脲类含氮化合物(尿囊素和尿囊酸)^[74](图3),通过维管系统将最终产物运送至地上部组织供给植物氮源,此种方式是一种相对高效的氮源长距离运输方式。而在苜蓿等豆科植物中,谷氨酰胺进一步转化为天冬酰胺,以天冬酰胺为主的氨基酸作为氮源运送至植物的地上部组织。在大豆中,黄嘌呤脱氢酶GmXDH和尿酸酶GmUOX的基因敲除突变株均表现出缺氮和根瘤早衰的表型。其中,uox突变体根瘤内部呈现白绿色、根瘤中的Lb含量减少、侵染细胞坍塌、

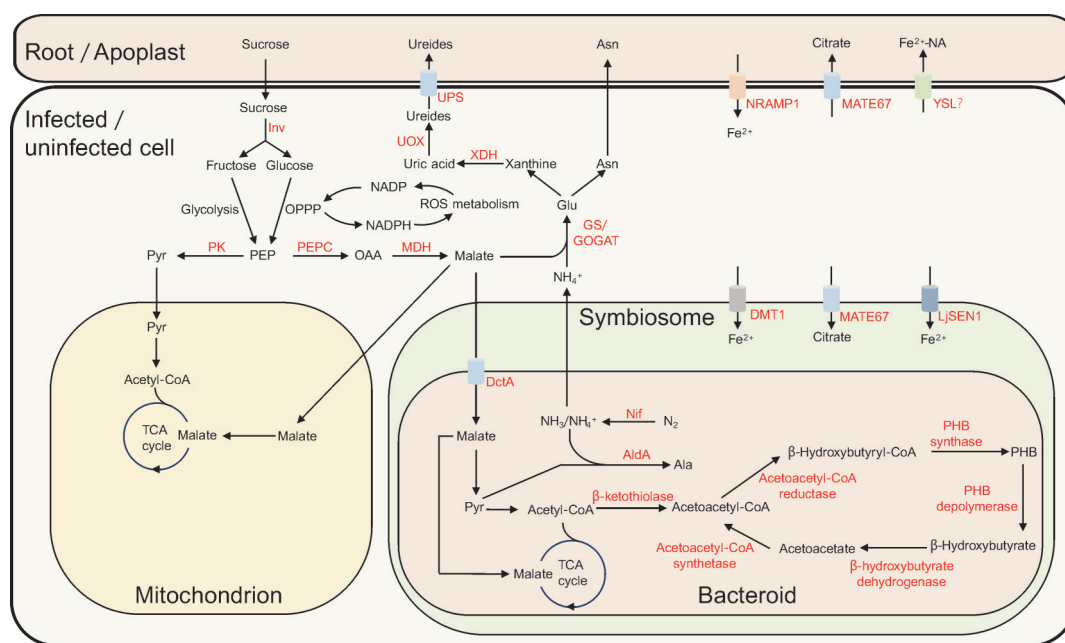
细胞质降解^[74]。大豆的GmUPS1(ureide permease 1)和GmUPS2(ureide permease 2)被证明在尿囊素和尿囊酸从根瘤中运送的过程中发挥重要作用。这2种转运蛋白定位于细胞质膜,并在根瘤皮层和维管内皮层细胞中表达。抑制根瘤中GmUPS1-1和GmUPS1-2的表达会导致酰脲的积累,并减少氮分配到根部和茎部^[75]。

根瘤衰老导致类菌体固氮酶活性下降,氮化合物合成减少,增强了植物对外源氮素的依赖。当紫花苜蓿落叶之后,根瘤开始进入衰老阶段,此时,与氮同化相关的酶活性均降低^[76],这意味着根瘤氮固定能力开始下降。抑制苜蓿GS的活性会触发根瘤快速进行防御反应,引发根瘤的早衰。此外,GS的抑制还引发了连续的物质代谢变化^[77],这暗示GS在调节根瘤物质代谢中起到关键作用。自由生活的根瘤菌也通过GS/GOGAT系统进行氮同化,当进入共生模式之后,根瘤菌的GS和GOGAT基因表达受到抑制,氮同化能力减弱^[5],但是不同根瘤菌的GS和GOGAT基因突变体的共生表型不尽相同。百脉根根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)的GS基因突变之后,植株表现为衰老根瘤的数目增加,固氮酶活性显著降低^[78]。豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)的gltB(编码GOGAT)突变体表现为复杂的表型,这是因为氨基酸转运蛋白在转录后被抑制而无法利用大多数有机氮源^[79]。大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的GOGAT和GS I/GS II突变体则是完全不固氮表型^[80]。但是对菜豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)的gltB突变体共生表型的研究结果则截然相反,Ferraiolide等^[81]研究表明gltB突变体根瘤菌在根瘤中的固氮酶活降低;而在另一项研究中,gltB突变体接种豌豆后,植株的氮供应得到了加强^[82]。

根瘤中的碳氮代谢途径紧密关联,形成了复杂的调控网络(图3),为共生固氮提供了重要支持^[5]。然而,在根瘤衰老或环境胁迫条件下,这种碳氮代谢的平衡受到破坏,导致固氮能力下降和根瘤功能受损。解析和优化这些代谢途径的调控过程,不仅可以提高根瘤的固氮效率和延长其寿命,还能够增强根瘤在胁迫环境下的抗逆能力。

3.3 衰老根瘤的铁代谢调控

共生固氮的关键是合成一系列以铁为催化核心的金属酶。铁从维管束中释放出来,进入根瘤细胞壁间隙即质外体(apoplast)部位^[83]。侵染细胞随后



N_2 : Dinitrogen; NH_3/NH_4^+ : Ammonia/ammonium; Glu: Glutamate; GOGAT: Glutamate synthase; GS: Glutamine synthetase; Ala: Alanine; Asn: Asparagine; UOX: Uricase; XDH: Xanthine dehydrogenase; AldA: Ala dehydrogenase; Nif: Nitrogenase; Inv: Invertase; OPPP: Oxidative pentose phosphate pathway; PEP: Phosphoenolpyruvate; PEPC: PEP carboxylase; Pyr: Pyruvate; PK: Pyruvate kinase; MDH: Malate dehydrogenase; OAA: Oxaloacetate; TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle; PHB: Poly- β -hydroxybutyrate; NA: Nicotinamide; UPS: Ureide permease.

图3 豆科植物根瘤中碳素、氮素、PHB和铁的代谢

Fig. 3 Metabolism of carbon, nitrogen, PHB, and iron in legume nodules

吸收细胞壁间隙中的铁并将其传递给植物细胞和共生体以合成含铁蛋白,参与这个过程的与铁转运相关蛋白包括 NRAMP1、MATE67、DMT1 和 LjSEN1^[83](图3)。而根瘤进入衰老期之后,以Lb蛋白为代表的含铁蛋白降解释放出大量的铁,抑制了固氮活性,从而进一步促使根瘤衰老,因此Lb中的铁在促进根瘤衰老中起着关键作用。与Lb结合的血红素被HO1降解释放铁离子^[9]。衰老根瘤细胞的细胞质的酸化促进了Lb的自氧化以及超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)的产生。已知 H_2O_2 可以使Lb中的铁释放,共生体膜是这些游离铁攻击的首要目标^[12]。在衰老根瘤的皮层中铁蛋白的表达量增加,可能是为了遏制衰老期间铁在细胞中的扩散^[10, 84-85],从而抑制游离铁的毒性和延长根瘤的固氮活性。

利用同步辐射X射线荧光(synchrotron-based X-ray fluorescence, S-XRF)检测根瘤,发现铁在衰老的根瘤中被重新定位到维管束中^[86],推测这些铁可能被运输到地上部后再被植物的种子利用。利用放射性同位素标记技术发现根瘤在种子灌浆时损失了40%~58%的铁^[87],因此根瘤可能会为种子发育提

供大部分的铁。这种铁可能以烟酰胺(nicotinamide, NA)螯合物的形式通过韧皮部运输到种子中^[88]。NA合成酶(NA synthetase, NAS)催化NA的合成,后者是一种金属离子螯合剂,能与多种金属离子形成络合物。与LjNAS1相比,百脉根LjNAS2在晚期表达并特异地定位在根瘤维管束中。因此,如果根瘤中的铁被重新动员,铁可能以 Fe^{2+} -NA形式进行运输。由于YSL转运蛋白参与铁-烟酰胺络合物的长距离运输,因此该家族的成员可能参与衰老根瘤中铁的转运和回收,但其工作机制未被探明。

3.4 类菌体PHB的代谢调控

聚 β -羟基丁酸(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)作为一类含碳化合物,是维持根瘤菌固氮效率的重要能源物质,它的合成和降解与根瘤菌的固氮效率紧密相关。对于一些形成定型根瘤的根瘤菌,PHB在类菌体中含量比较丰富,最高能达到类菌体干质量的70%。2个乙酰辅酶A分子首先合成乙酰乙酰辅酶A,然后由乙酰乙酰辅酶A还原酶和PHB合酶的作用下生成PHB分子(图3)。因此,它既是碳的储存库,也是还原剂的储存库。定型根瘤(如大豆、百脉根)的类菌体在衰老的根瘤中储备PHB,而不定型根

瘤(如豌豆或苜蓿)的类菌体则不然。然而,当碳代谢受到干扰或阻止 PHB 降解时,豌豆或苜蓿的不定型根瘤的类菌体中也可以检测到 PHB 颗粒,这表明在正常情况下,PHB 会迅速合成和转化。PHB 的大量积累是根瘤衰老的一个明显的特征^[74, 89-90],促使 PHB 合成的原因包括细胞氧化还原状态的转变、氮碳平衡的失调以及类菌体降解和利用 PHB 能力的破坏^[91]。目前对衰老根瘤中 PHB 的研究还很少,已有的研究多局限于对根瘤中 PHB 的显微观察与生化鉴定。

GmcA(GMC oxidoreductase)是一种属于 GMC(glucose-methanol-choline oxidase)家族的氧化还原酶。豌豆根瘤菌 *R. leguminosarum* 的 GmcA 在共生固氮中起着重要作用,*gmcA* 突变体根瘤表现出严重的固氮能力下降和早衰表型,同时伴随着 PHB 颗粒的积累^[92]。植物的基因突变也会导致 PHB 的积累。根瘤中的尿酸酶 GmUOX 在氮固定和根瘤发育中起关键作用,*gmUox* 突变体根瘤表现出早衰表型,类菌体中含有更多的 PHB 颗粒^[74]。百脉根 Lb 突变体 *lb123* 表现为根瘤早衰,PHB 颗粒在突变体中积累^[58]。PHB 在 *lb123* 突变体中的积累可能是 ROS 或 RNS 的积累对线粒体产生了毒害作用而间接导致的。BI-1(Bax-inhibitor 1)是一种保守的细胞死亡抑制因子,它参与调节植物对非生物胁迫和病原体攻击的细胞死亡反应。在菜豆中超表达 *PvBI-1a* 会增加根瘤菌侵染事件,但也会导致根瘤细胞的早衰以及类菌体中 PHB 的积累^[89]。*PvBI-1a* 的超表达影响了防御、自噬和囊泡运输相关基因的表达,这些过程影响植物-微生物的相互作用。

3.5 ROS在根瘤中的功能与调节途径

根瘤中 ROS 的产生途径包括质膜酶系统的作用、固氮过程中的自氧化反应、氧合豆血红蛋白与 H_2O_2 的反应以及随着根瘤衰老和胁迫诱导产生的过氧化物、蛋白质羰基团、游离铁与膜脂质之间的过氧化反应等^[6, 93](图4)。过多的 ROS 积累会导致 DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤,并最终导致细胞死亡^[94]。在根瘤细胞中产生的最主要的 ROS 包括 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、单线态氧(1O_2)和羟基自由基($\cdot HO$)^[93]。

Lb 基因缺失的百脉根根瘤在其中央侵染区积累过量的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 ,部分突变体根瘤中的 $O_2^{\cdot-}$ 分布是不均匀的,而侵染区边缘位置积累量更为丰富^[58],*Lb* 基因的敲除导致这一区域可能具有更高的游离氧浓度,从而导致 $O_2^{\cdot-}$ 的增加。*Lb* 功能的发挥离不开

辅基血红素,游离血红素是氧化还原活性铁的来源,其螯合的二价铁离子能够参与芬顿反应(Fenton reaction)而产生有毒的 $\cdot HO$ 。百脉根 *LjHO1* 负责根瘤中血红素的分解(图4),该基因缺失导致根瘤中 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的积累以及固氮酶活性的降低^[9]。在超表达半胱氨酸蛋白酶基因 *MtCP77* 植株根瘤中检测到 ROS 积累,ROS 可能通过促进植物细胞程序性死亡来加速根瘤衰老。根瘤的免疫防御和衰老之间存在交互影响^[95]。蒺藜苜蓿 NAD1(nodules with activated defense 1)通过抑制 RbohB(respiratory burst oxidase homologs B)和 RbohD(respiratory burst oxidase homologs D)来降低 ROS 的产生,从而抑制免疫,对应的 *nad1* 突变体表现出根瘤早衰^[96]。ROS 在共生固氮过程中也具有积极的作用,在菜豆中超表达 *PvRBOHB* 导致 ROS 的积累和衰老的延迟,这表明 ROS 在菜豆中可能作为抗衰老因子^[97]。中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的 LysR 调节基因 *lsrB* 通过抑制 ROS 暴发或宿主细胞的防御反应在类菌体分化过程中发挥重要作用,该基因的缺失导致根瘤的早衰和类菌体形态的异常^[98-99]。

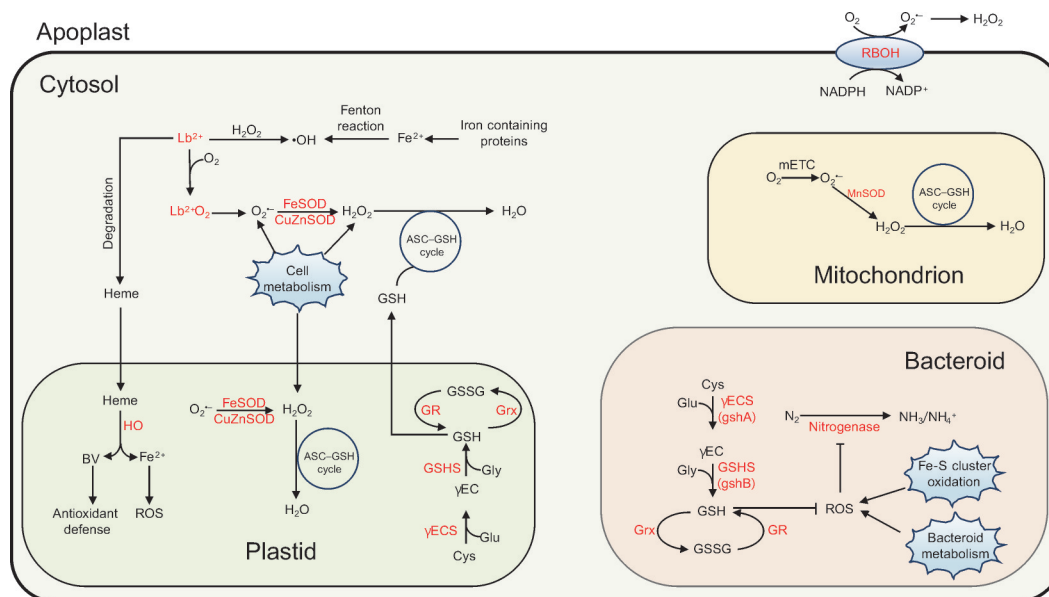
ROS(如 H_2O_2)被证明可以作为调节根瘤衰老的信号分子,其浓度受到抗氧化酶和抗氧化物的严格调控(图4)。ROS 参与共生的多个阶段,从根瘤菌感染到根瘤衰老^[93],但是它的生成、清除以及在根瘤中的功能和调控机制还需要深入研究。

3.6 谷胱甘肽的合成机制及抗氧化功能

为了降低活性氧化物给植物细胞和类菌体带来的损伤,根瘤合成1种小分子抗氧化物—GSH(谷胱甘肽,glutathione)。GSH 在植物中广泛参与过氧化物的清除、硫的运输和储存、氧化还原状态的控制以及重金属的解毒等过程^[100]。GSH 通过由 γ -谷氨酰胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -ECS)和谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase,GSHS)催化的2个ATP依赖性反应来合成(图4)。然而,根瘤细胞质中的主要抗氧化途径是抗坏血酸-谷胱甘肽循环(ascorbate-glutathione cycle,ACS-GSH cycle)(图4),通过此循环完成对 H_2O_2 的解毒需要消耗 NAD(P)H。同型谷胱甘肽(homoglutathione,hGSH),作为 GSH 的同系物,也存在于豆科植物的根瘤中,由 hGSH 合成酶(homoglutathione synthetase,hGSHS)催化合成。在豌豆、蚕豆、苜蓿、羽扇豆、绿豆以及豇豆根瘤中,GSH 和 hGSH 的含量都极其丰富^[101]。

固氮酶活性与根瘤中(h)GSH含量之间存在很强的正相关性。抑制(h)GSH在蒺藜苜蓿的含量会减少植株根瘤的形成,这表明GSH和hGSH在早期根瘤形成的过程中起着至关重要的作用^[102]。此外,豆科植物根瘤中的GSH和hGSH含量影响着根瘤的固氮效率。降低或提高GSH合成基因 γ ECS在蒺藜苜蓿中的表达量会显著减少或增加与共生相关基因的表达,继而影响根瘤的大小和固氮酶活性^[103]。类

菌体中GSH合成缺陷严重影响根瘤固氮。根瘤菌的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(*gshA*)和谷胱甘肽合成酶基因(*gshB*)的突变体表现出根瘤菌侵染受阻、结瘤延迟和根瘤早衰的现象^[104]。有趣的是,菜豆根瘤菌*R. etli*的*gsh*基因和*gor*基因(编码谷胱甘肽还原酶)突变体还表现出严重的氨基酸吸收抑制^[105]。这些研究表明GSH等抗氧化剂对于调控根瘤发育过程中的ROS水平至关重要。



GR: Glutathione reductase; Grx: Glutaredoxin; γ EC: γ -Glutamylcysteine; γ ECS: γ -Glutamylcysteine synthetase; Cys: Cysteine; Gly: Glycine; Glu: Glutamate; GSH/GSSG: Reduced/oxidized glutathione; GSHS: Glutathione synthetase; HO: Heme oxygenase; ROS: Reactive oxygen species; BV: Biliverdin; RBOH: Respiratory burst homolog (NADPH-oxidase); SOD: Superoxide dismutase; mETC: Mitochondrial electron transport chain; $Lb^{2+}O_2$: Oxyferrous leghemoglobin; ACS-GSH cycle: Ascorbate-glutathione cycle.

图4 豆科植物根瘤中ROS和GSH的代谢

Fig.4 Metabolism of ROS and GSH in legume nodules

4 结语与展望

延缓根瘤衰老和延长固氮时间是提高根瘤固氮效率的重要途径。本文综述了根瘤衰老的结构和生理特征、根瘤衰老诱导的调控机制以及关键物质的合成和代谢途径。这些机制和途径的阐明将为提高固氮效率提供重要的理论基础。但是对根瘤共生系统中的衰老关键分子机制的深入解析仍然存在许多未解之谜和挑战。未来的研究可以进一步探索共生根瘤中的作用机制和调控网络。结合代谢组学和转录组学等高通量技术,全面解析根瘤中碳氮代谢的调控网络,将有助于揭示根瘤固氮作用中碳源和氮源之间的代谢耦合,以及相关基因和代谢产物的调控机制。根瘤衰老的氧化还原调控主要依赖于ROS和抗氧化系统,而两者之间平衡的机制尚不清楚。

探究抗氧化物质合成途径的调控机制,以及这类物质在根瘤共生中的作用机制,将为提高植物抗氧化应激的能力提供新的策略。NO作为豆科植物和根瘤菌之间相互作用的一种信号分子,是影响根瘤衰老的重要因素,然而,NO调控的根瘤衰老机制仍然未知。深入研究铁在根瘤中的运输和回收机制以及对根瘤生长发育的影响,可为豆科植物提高铁的利用效率提供新的思路。PHB不仅在能量储备中发挥作用,还可能影响根瘤中酰胺的合成和分解^[74],进而影响植物整体的氮素利用效率和生长状况,PHB在衰老根瘤中所发挥的功能值得进一步研究。随着以基因编辑和单细胞时空组学等为代表的生物技术的飞速发展,将有更多的参与根瘤衰老的信号通路和物质代谢通路被鉴定和阐明。深入研究根瘤衰老机

制将为培育具有更强抗逆能力和更高固氮效率的豆科作物新种质提供新的方法和思路。

参考文献 References

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] NISHIDA H, SUZAKI T. Nitrate-mediated control of root nodule symbiosis[J]. Current opinion in plant biology, 2018, 44: 129-136.
- [4] 杨军, 刘承武, 李霞, 等. 豆科植物-微生物共生固氮研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, 59(8): 1407-1435. YANG J, LIU C W, LI X, et al. Advances in the legume-rhizobia symbiosis[J]. Plant physiology journal, 2023, 59(8): 1407-1435 (in Chinese with English abstract).
- [5] UDVARDI M, POOLE P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses[J]. Annual review of plant biology, 2013, 64: 781-805.
- [6] PUPPO A, GROTEN K, BASTIAN F, et al. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process[J]. New phytologist, 2005, 165(3): 683-701.
- [7] VAN DE VELDE W, GUERRA J C P, DE KEYSER A, et al. Aging in legume symbiosis: a molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula* [J]. Plant physiology, 2006, 141(2): 711-720.
- [8] NAVASCUÉS J, PÉREZ-RONTOMÉ C, GAY M, et al. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules[J]. PNAS, 2012, 109(7): 2660-2665.
- [9] 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.
- [10] LUCAS M M, VAN DE SYPE G, HÉROUART D, et al. Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules[J]. Protoplasma, 1998, 204(1): 61-70.
- [11] GROSSI E, CORDEIRO L, CAETANO F H. Nodule ultrastructure and initial growth of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth.) altschul plants infected with rhizobia[J]. Annals of botany, 2002, 90(2): 175-183.
- [12] HERRADA G, PUPPO A, MOREAU S, et al. How is leghemoglobin involved in peribacteroid membrane degradation during nodule senescence? [J]. FEBS letters, 1993, 326(1/2/3): 33-38.
- [13] KAZMIERCZAK T, YANG L, BONCOMPAGNI E, et al. Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant cells[J]. Advances in botanical research, 2020, 94: 181-212.
- [14] CHU A C P, ROBERTSON A G. The effects of shading and defoliation on nodulation and nitrogen fixation by white clover [J]. Plant and soil, 1974, 41(3): 509-519.
- [15] ZHOU S X, ZHANG C J, HUANG Y, et al. Characteristics and research progress of legume nodule senescence [J/OL]. Plants, 2021, 10(6): 1103 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3390/plants10061103>.
- [16] MATAMOROS M A, BAIRD L M, ESCUREDO P R, et al. Stress-induced legume root nodule senescence: physiological, biochemical, and structural alterations [J]. Plant physiology, 1999, 121(1): 97-112.
- [17] DHANUSHKODI R, MATTHEW C, MCMANUS M T, et al. Drought-induced senescence of *Medicago truncatula* nodules involves serpin and ferritin to control proteolytic activity and iron levels[J]. New phytologist, 2018, 220(1): 196-208.
- [18] SWARAJ K, BISHNOI N R. Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes [J]. Indian journal of experimental biology, 1999, 37(9): 843-848.
- [19] HE C M, GAO H, WANG H J, et al. GSK3-mediated stress signaling inhibits legume-rhizobium symbiosis by phosphorylating GmNSP1 in soybean [J]. Molecular plant, 2021, 14(3): 488-502.
- [20] SEROVA T A, TSYGANOVA A V, TSYGANOV V E. Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages [J]. Protoplasma, 2018, 255(5): 1443-1459.
- [21] GUINEL F C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation [J/OL]. Frontiers in plant science, 2015, 6: 1121 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01121>.
- [22] NAKATA M, OHME-TAKAGI M. Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC₂-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility [J/OL]. Plant signaling & behavior, 2013, 8(12): e26473 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.4161/psb.26473>.
- [23] ZDYB A, DEMCHENKO K, HEUMANN J, et al. Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules [J]. New phytologist, 2011, 189(2): 568-579.
- [24] SEROVA T A, TSYGANOVA A V, TIKHONOVICH I A, et al. Gibberellins inhibit nodule senescence and stimulate nodule meristem bifurcation in pea (*Pisum sativum* L.) [J/OL]. Frontiers in plant science, 2019, 10: 285 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00285>.
- [25] REHMAN N U, LI X, ZENG P C, et al. Harmony but not uniformity: role of strigolactone in plants [J/OL]. Biomolecules, 2021, 11(11): 1616 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3390/biom11111616>.
- [26] SOTO M J, FERNÁNDEZ-APARICIO M, CASTELLA-

- NOS-MORALES V, et al. First indications for the involvement of strigolactones on nodule formation in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Soil biology and biochemistry, 2010, 42 (2): 383-385.
- [27] LIU J W, NOVERO M, CHARNIKHOVA T, et al. Carotenoid cleavage dioxygenase 7 modulates plant growth, reproduction, senescence, and determinate nodulation in the model legume *Lotus japonicus* [J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(7):1967-1981.
- [28] FOO E, DAVIES N W. Strigolactones promote nodulation in pea [J]. Planta, 2011, 234(5):1073-1081.
- [29] FOO E, YONEYAMA K, HUGILL C J, et al. Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency [J]. Molecular plant, 2013, 6(1):76-87.
- [30] VAN DINGENEN J, DE KEYSER A, DESMET S, et al. Strigolactones repress nodule development and senescence in pea [J]. The plant journal, 2023, 116(1):7-22.
- [31] PANDE A, MUN B G, LEE D S, et al. NO network for plant-microbe communication underground: a review [J/OL]. Frontiers in plant science, 2021, 12:658679 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.658679>.
- [32] BERGER A, BOSCARI A, PUPPO A, et al. Nitrate reductases and hemoglobins control nitrogen-fixing symbiosis by regulating nitric oxide accumulation [J]. Journal of experimental botany, 2021, 72(3):873-884.
- [33] SIGNORELLI S, SAINZ M, TABARES-DA ROSA S, et al. The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes [J/OL]. Frontiers in plant science, 2020, 11: 521 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00521>.
- [34] FUKUDOME M, WATANABE E, OSUKI K I, et al. Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytohemoglobin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence [J]. Plant & cell physiology, 2019, 60(4):816-825.
- [35] CAM Y, PIERRE O, BONCOMPAGNI E, et al. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules [J]. New phytologist, 2012, 196(2):548-560.
- [36] BLANQUET P, SILVA L, CATRICE O, et al. *Sinorhizobium meliloti* controls nitric oxide-mediated post-translational modification of a *Medicago truncatula* nodule protein [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2015, 28(12):1353-1363.
- [37] BRUAND C, MEILHOC E. Nitric oxide in plants: pro- or anti-senescence [J]. Journal of experimental botany, 2019, 70 (17):4419-4427.
- [38] MEILHOC E, CAM Y, SKAPSKI A, et al. The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2010, 23 (6):748-759.
- [39] SAUVIAC L, RÉMY A, HUAULT E, et al. A dual legume-rhizobium transcriptome of symbiotic nodule senescence reveals coordinated plant and bacterial responses [J]. Plant, cell & environment, 2022, 45(10):3100-3121.
- [40] WANG L L, TIAN T, LIANG J J, et al. A transcription factor of the NAC family regulates nitrate-induced legume nodule senescence [J]. New phytologist, 2023, 238(5):2113-2129.
- [41] WANG X, QIU Z M, ZHU W J, et al. The NAC transcription factors SNAP1/2/3/4 are central regulators mediating high nitrogen responses in mature nodules of soybean [J/OL]. Nature communications, 2023, 14 (1): 4711 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40392-w>.
- [42] WANG X D, CHEN K, ZHOU M M, et al. GmNAC181 promotes symbiotic nodulation and salt tolerance of nodulation by directly regulating GmNINa expression in soybean [J]. New phytologist, 2022, 236(2):656-670.
- [43] DE ZÉLICOURT A, DIET A, MARION J, et al. Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence [J]. The plant journal, 2012, 70(2):220-230.
- [44] DENG J, ZHU F G, LIU J X, et al. Transcription factor bHLH2 represses *CYSTEINE PROTEASE77* to negatively regulate nodule senescence [J]. Plant physiology, 2019, 181 (4):1683-1703.
- [45] YU H X, XIAO A F, WU J S, et al. GmNAC039 and GmNAC018 activate the expression of cysteine protease genes to promote soybean nodule senescence [J]. The plant cell, 2023, 35(8):2929-2951.
- [46] VAN WYK S G, DU PLESSIS M, CULLIS C A, et al. Cysteine protease and cystatin expression and activity during soybean nodule development and senescence [J/OL]. BMC plant biology, 2014, 14: 294 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0294-3>.
- [47] PIERRE O, HOPKINS J, COMBIER M, et al. Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules [J]. New phytologist, 2014, 202 (3):849-863.
- [48] LEE H, HUR C G, OH C J, et al. Analysis of the root nodule-enhanced transcriptome in soybean [J]. Molecules and cells, 2004, 18(1):53-62.
- [49] PÉREZ GUERRA J C, COUSSENS G, DE KEYSER A, et al. Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula* [J]. Plant physiology, 2010, 152(3):1574-1584.
- [50] KARDAILSKY I V, BREWIN N J. Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence [J]. Molecular plant-microbe interactions, 1996, 9(8):689-695.
- [51] LI Y X, ZHOU L, LI Y G, et al. A nodule-specific plant cysteine proteinase, AsNODF32, is involved in nodule senescence and nitrogen fixation activity of the green manure legume *As-tragalus sinicus* [J]. New phytologist, 2008, 180(1):185-192.
- [52] SHIMODA Y, NISHIGAYA Y, YAMAYA-ITO H, et al.

- The rhizobial autotransporter determines the symbiotic nitrogen fixation activity of *Lotus japonicus* in a host-specific manner[J]. PNAS, 2020, 117(3): 1806-1815.
- [53] YAMAYA-ITO H, SHIMODA Y, HAKOYAMA T, et al. Loss-of-function of aspartic peptidase nodule-induced 1 (apn1) in *Lotus japonicus* restricts efficient nitrogen-fixing symbiosis with specific *Mesorhizobium loti* strains[J]. The plant journal: for cell and molecular biology, 2018, 93(1): 5-16.
- [54] HAKOYAMA T, NIIMI K, WATANABE H, et al. Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation[J]. Nature, 2009, 462(7272): 514-517.
- [55] HAKOYAMA T, NIIMI K, YAMAMOTO T, et al. The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules[J]. Plant & cell physiology, 2012, 53(1): 225-236.
- [56] CERRI M R, FRANCES L, KELNER A, et al. The symbiosis-related ERN transcription factors act in concert to coordinate rhizobial host root infection[J]. Plant physiology, 2016, 171(2): 1037-1054.
- [57] KRUSELL L, KRAUSE K, OTT T, et al. The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules[J]. Plant cell, 2005, 17(5): 1625-1636.
- [58] 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.
- [59] MITRA R M, LONG S R. Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis[J]. Plant physiology, 2004, 134(2): 595-604.
- [60] HIRSCH A M, SMITH C A. Effects of *Rhizobium meliloti* nif and fix mutants on alfalfa root nodule development[J]. Journal of bacteriology, 1987, 169(3): 1137-1146.
- [61] HIRSCH A M, BANG M, AUSUBEL F M. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by nif: Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*[J]. Journal of bacteriology, 1983, 155(1): 367-380.
- [62] SCHULZE J, ADGO E, MERBACH W. Carbon costs associated with N₂ fixation in *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. over a 14-day period[J]. Plant biology, 1999, 1(6): 625-631.
- [63] LEPETIT M, BROUQUISSE R. New insights into the control of symbiotic nitrogen fixation by carbon supply[J]. Molecular plant, 2023, 16(11): 1724-1726.
- [64] TAKANASHI K, TAKAHASHI H, SAKURAI N, et al. Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicus* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2012, 25(7): 869-876.
- [65] GORDON A J, MINCHIN F R, JAMES C L, et al. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation[J]. Plant physiology, 1999, 120(3): 867-878.
- [66] FLEMETAKIS E, EFROSE R C, OTT T, et al. Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase[J]. Plant molecular biology, 2006, 62(1/2): 53-69.
- [67] THUMMLER F, VERMA D P. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules[J]. Journal of biological chemistry, 1987, 262(30): 14730-14736.
- [68] LEPETIT M, BROUQUISSE R. Control of the rhizobium-legume symbiosis by the plant nitrogen demand is tightly integrated at the whole plant level and requires inter-organ systemic signaling [J/OL]. Frontiers in plant science, 2023, 14: 1114840 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114840>.
- [69] KE X L, XIAO H, PENG Y Q, et al. Phosphoenolpyruvate re-allocation links nitrogen fixation rates to root nodule energy state[J]. Science, 2022, 378(6623): 971-977.
- [70] GUO D, LIU P, LIU Q W, et al. Legume-specific SnRK1 promotes malate supply to bacteroids for symbiotic nitrogen fixation[J]. Molecular plant, 2023, 16(9): 1396-1412.
- [71] ANTHON G E, EMERICH D W. Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules[J]. Plant physiology, 1990, 92(2): 346-351.
- [72] D'HAESELEER K, DE KEYSER A, GOORMACHTIG S, et al. Transcription factor MtATB2: about nodulation, sucrose and senescence [J]. Plant & cell physiology, 2010, 51(9): 1416-1424.
- [73] WHITE J, PRELL J, JAMES E K, et al. Nutrient sharing between symbionts[J]. Plant physiology, 2007, 144(2): 604-614.
- [74] NGUYEN C X, DOHNALKOVA A, HANCOCK C N, et al. Critical role for uricase and xanthine dehydrogenase in soybean nitrogen fixation and nodule development [J/OL]. The plant genome, 2023, 16(2): e20171 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20172>.
- [75] COLLIER R, TEGEDER M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export[J]. The plant journal, 2012, 72(3): 355-367.
- [76] EGLI M A, GRIFFITH S M, MILLER S S, et al. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules [J]. Plant physiology, 1989, 91(3): 898-904.
- [77] SEABRA A R, PEREIRA P A, BECKER J D, et al. Inhibition of glutamine synthetase by phosphinothricin leads to transcriptome reprogramming in root nodules of *Medicago truncatula* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2012, 25(7): 976-992.
- [78] CHUNGOPAST S, THAPANAPONGWORAKUL P,

- MATSUURA H, et al. Glutamine synthetase I-deficiency in *Mesorhizobium loti* differentially affects nodule development and activity in *Lotus japonicus* [J]. Journal of plant physiology, 2014, 171(5):104-108.
- [79] MULLEY G, WHITE J P, KARUNAKARAN R, et al. Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources [J]. Molecular microbiology, 2011, 80(1):149-167.
- [80] CARLSON T A, MARTIN G B, CHELM B K. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. Journal of bacteriology, 1987, 169(12):5861-5866.
- [81] FERRAIOLI S, TATÈ R, CERMOLA M, et al. Auxotrophic mutant strains of *Rhizobium etli* reveal new nodule development phenotypes [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2002, 15(5):501-510.
- [82] CASTILLO A, TABOADA H, MENDOZA A, et al. Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli* [J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt 7):1627-1637.
- [83] BREAR E M, DAY D A, SMITH P M C. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis [J/OL]. Frontiers in plant science, 2013, 4:359 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00359>.
- [84] CHUNGOPAST S, DUANGKHET M, TAJIMA S, et al. Iron-induced nitric oxide leads to an increase in the expression of ferritin during the senescence of *Lotus japonicus* nodules [J]. Journal of plant physiology, 2017, 208:40-46.
- [85] STROZYCKI P M, SZCZUREK A, LOTOCKA B, et al. Ferritins and nodulation in *Lupinus luteus*: iron management in indeterminate type nodules [J]. Journal of experimental botany, 2007, 58(12):3145-3153.
- [86] RODRÍGUEZ-HAAS B, FINNEY L, VOGT S, et al. Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules [J]. Metallomics: integrated biometal science, 2013, 5(9):1247-1253.
- [87] BURTON J W, HARLOW C, THEIL E C. Evidence for re-utilization of nodule iron in soybean seed development [J]. Journal of plant nutrition, 1998, 21(5):913-927.
- [88] HAKOYAMA T, WATANABE H, TOMITA J, et al. Nicotianamine synthase specifically expressed in root nodules of *Lotus japonicus* [J]. Planta, 2009, 230(2):309-317.
- [89] HERNÁNDEZ-LÓPEZ A, DÍAZ M, RODRÍGUEZ-LÓPEZ J, et al. Uncovering Bax inhibitor-1 dual role in the legume-rhizobia symbiosis in common bean roots [J]. Journal of experimental botany, 2019, 70(3):1049-1061.
- [90] STRODTMAN K N, FRANK S, STEVENSON S, et al. Proteomic characterization of *Bradyrhizobium diazoefficiens* bacteroids reveals a post-symbiotic, hemibiotrophic-like lifestyle of the bacteria within senescing soybean nodules [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(12):3947 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3390/ijms19123947>.
- [91] LODWIG E, POOLE P. Metabolism of *Rhizobium* Bacteroids [J]. Critical reviews in plant sciences, 2003, 22(1):37-78.
- [92] ZOU Q, LUO S, WU H T, et al. A GMC oxidoreductase Gm-cA is required for symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2020, 11:394 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00394>.
- [93] MINGUILLÓN S, MATAMOROS M A, DUANMU D Q, et al. Signaling by reactive molecules and antioxidants in legume nodules [J]. New phytologist, 2022, 236(3):815-832.
- [94] TRIPATHY B C, OELMÜLLER R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants [J]. Plant signaling & behavior, 2012, 7(12):1621-1633.
- [95] BERRABAH F, BENACEUR F, YIN C Y, et al. Defense and senescence interplay in legume nodules [J/OL]. Plant communications, 2024, 5(4):100888 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100888>.
- [96] WANG C, YU H X, LUO L, et al. Nodules with activated defense 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *medicago truncatula* [J]. New phytologist, 2016, 212(1):176-191.
- [97] ARTHIKALA M K, SÁNCHEZ-LÓPEZ R, NAVA N, et al. RhobB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization [J]. New phytologist, 2014, 202(3):886-900.
- [98] SYSKA C, BROUQUISSE R, ALLOING G, et al. Molecular weapons contribute to intracellular rhizobia accommodation within legume host cell [J/OL]. Frontiers in plant science, 2019, 10:1496 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01496>.
- [99] TANG G R, LU D W, WANG D, et al. *Sinorhizobium meliloti* lsrB is involved in alfalfa root nodule development and nitrogen-fixing bacteroid differentiation [J]. Chinese science bulletin, 2013, 58(33):4077-4083.
- [100] DUBREUIL-MAURIZI C, POINSSOT B. Role of glutathione in plant signaling under biotic stress [J]. Plant signaling & behavior, 2012, 7(2):210-212.
- [101] MATAMOROS M A, MORAN J F, ITURBE-ORMAETXE I, et al. Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules [J]. Plant physiology, 1999, 121(3):879-888.
- [102] FRENDÓ P, HARRISON J, NORMAN C, et al. Glutathione and homogluthathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula* [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2005, 18(3):254-259.
- [103] EL MSEHLI S, LAMBERT A, BALDACCI-CRESP F, et al. Crucial role of (homo) glutathione in nitrogen fixation in

- Medicago truncatula* nodules [J]. New phytologist, 2011, 192 (2): 496-506.
- [104] MANDON K, NAZARET F, FARAJZADEH D, et al. Redox regulation in diazotrophic bacteria in interaction with plants [J/OL]. Antioxidants, 2021, 10 (6) : 880 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3390/antiox10060880>.
- [105] TATÉ R, CERMOLA M, RICCIO A, et al. Glutathione is required by *Rhizobium etli* for glutamine utilization and symbiotic effectiveness [J]. Molecular plant-microbe interactions, 2012, 25(3): 331-340.

Advances in studying metabolic regulation during senescence of nitrogen-fixing nodule in legumes

ZHOU Yu¹, DUANMU Deqiang²

1. College of Biological and Food Engineering, Suzhou University,
Anhui Province, Suzhou 234000, China;

2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Senescence is one of the major factors affecting the efficiency of nitrogen fixation in legume nodules, and in-depth studying the regulatory mechanisms of the senescence of nodule is of great significance. This article reviewed the progress on studying the senescence of nodule from the aspects including morphological characteristics, physiological and biochemical changes, pathways of senescence, and the regulation of material metabolism. The functions of senescence-related genes in both legume and rhizobia during the process of symbiotic nitrogen fixation were summarized. It is put forward that developing new methods and technologies of studying can contribute to a more thorough elucidation of the molecular mechanisms underlying the metabolism of key substances in the senescence of nodules. A thorough understanding of the molecular mechanisms of the senescence of nodule can be helpful for the genetic modification of delaying the senescence of nodule, thereby improving the efficiency of nitrogen fixation in leguminous plants and promoting the sustainable development of agricultural production.

Keywords symbiotic nitrogen fixation; the senescence of nodule; environmental stress; transcription regulation; material metabolism

(责任编辑:张志钰)