



联合固氮菌的合成生物学研究进展

荆晓姝^{*}, 丁燕, 韩晓梅, 王哲, 高德艳

山东省农业科学院, 葡萄研究院, 山东 济南 250000

摘要: 氮素是作物生长过程中最重要的元素, 氮素缺乏将会严重影响作物生长。随着人类对粮食的需求量增加, 化学氮肥的施用量越来越多。生物固氮在全球氮素循环中有着重要的作用, 60%的氮来源于生物固氮。因此, 生物固氮, 尤其是能够在作物中定殖的联合固氮菌, 最有可能代替氮肥成为粮食作物的主要氮源。长期以来, 如何提高生物固氮效率以及在作物中实现生物固氮是生物学家的重要研究方向。合成生物学的出现和发展为能够生物固氮的研究带了新的机遇, 有望缓解粮食作物对化学氮肥的大量需求。本文概述了固氮菌的种类、联合固氮菌中固氮基因岛的组成以及转录调控机理, 阐述了合成生物学在生物固氮领域中的研究现状, 对未来的联合固氮菌合成生物学的发展方向作出了展望。

关键词: 生物固氮, 合成生物学, 固氮基因岛, 联合固氮菌

氮素是维持地球生命的必需大量元素。化学氮肥的施用对提高农作物产量起着至关重要的作用, 然而化学氮肥的生产来自非可再生资源且是高耗能过程。随着人类对作物产量的需求越来越高, 作物增产的代价是化学氮肥的不合理利用以及后续的水体和大气污染。

全球固氮微生物固定的氮量占总量的 60%, 生物固氮最有希望代替化学氮肥成为粮食作物的主要氮源。利用生物固氮促进作物绿色安全生产, 实现“减肥减药”, 是农业可持续发展最有潜力的方向。

目前, 在作物培养中, 生物固氮远没有化学氮肥肥效高, 如何提高生物固氮的肥效, 完全或部分替代工业氮肥, 是目前研究的热点, 也是一个世界性的农业科技难题。近年来, 合成生物学的发展为生物固氮的研发带来了新的机遇。合成生物学中底盘生物的构建以及调控模块的优化是构建工程菌株的重要方面。同时, 基因编辑工具的发展, 为高效固氮工程菌株的构建提供了有力工具。因此, 利用合成生物学的理念和手段, 是提高生物固氮肥效的一个备选选择。

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2018BC004); 山东省农业科学院科技创新工程-高层次人才引进与培养科研启动费(370000219110001113677); 山东省葡萄研究院引导基金(SDAG2021B03)

^{*}通信作者。Tel/Fax: +86-531-85598057; E-mail: johncy@126.com

收稿日期: 2020-12-28; 修回日期: 2021-03-12; 网络出版日期: 2021-03-22

1 固氮微生物

1.1 根际促生菌

植物根际是细菌的良好生境, 为细菌提供了良好的生态位。这些定殖于植物根际、与植物根密切相关并且能够促进植物生长的细菌称为植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)。PGPR 对植物的直接促生作用包括: 产生植物生长调节物质(植物激素)、挥发性化合物(volatiles)以及 ACC 脱氨酶等, 降低植物体内的乙烯水平; 改进植物营养状况(如促进难溶性磷、钾和微量元素的释放, 固氮等); 刺激植物产生诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)。间接促生作用包括: 产生抗生素、抗菌蛋白或铁载体等抑制病原菌或者线虫, 减轻病害; 促进有益的共生作用(根瘤和菌根的形成); 降解农药等生物外源性物质^[1-2]。

1.2 生物固氮

生物固氮作用是全球氮循环的关键一步, 是固氮微生物在特定条件下, 如厌氧或微好氧、无铵或低铵等, 在固氮酶的催化作用下直接利用大气中 N_2 分子的一种特有的生理功能。根据微生物与植物之间的关系, 可以将生物固氮分为三种类型: 共生固氮菌(symbiotic nitrogen-fixing bacterium)、自生固氮菌(free-living nitrogen-fixing bacterium)和联合固氮菌(associative nitrogen-fixing bacterium)。其中自生固氮菌和联合固氮菌统称为非共生固氮菌^[3]。

共生固氮是指固氮微生物与植物互利共生进行固氮。主要有蓝藻共生固氮体系、豆科植物共生固氮体系和非豆科植物共生固氮体系。

自生固氮是指固氮微生物与植物没有依存关

系, 能够独立进行固氮。如圆褐固氮菌、棕色固氮菌、产酸克氏杆菌。

联合固氮作用是介于自生固氮和共生固氮体系之间的一种固氮类型。联合固氮菌与植物有着亲密关系, 但是不与植物形成类似根瘤的特异结构。这类菌株主要分布在植物根系表面, 有部分则侵入植物根的表皮皮层组织或者进入维管组织, 可以利用根系分泌物生长繁殖, 能够原位靶向地为植物提供可以直接利用的氮肥。禾本科植物中固氮微生物的首次发现证明了这类植物具有生物固氮潜能^[4]。之后, 又陆续发现了固氮菌属(*Azotobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等与禾本科植物联合固氮的细菌。

2 联合固氮菌的固氮基因簇研究进展

由于联合固氮菌可以与玉米、小麦和水稻等禾本作物共生固氮, 是解决禾谷类作物部分氮素来源的途径之一, 近年来日益得到重视。联合固氮菌中研究比较深入的有类芽孢杆菌和假单胞菌。比较基因组学研究表明, 类芽孢杆菌和假单胞菌固氮基因岛是在自然环境下通过水平转移途径获得, 进化过程中存在固氮酶基因选择性丢失、复制和重排的现象。这些基因有编码固氮酶的结构基因, 也有参与调控、激活、金属原子传递和功能生物合成的一系列基因, 但是固氮核心操纵子却高度保守^[5-7]。

2.1 固氮基因簇

固氮基因簇的大小从 11 kb 到 64 kb 不等, 包含合成具有生物活性的固氮酶的基因、电子传递链和氧保护机制等。固氮酶的活性中心由金属原

子簇组成：根据金属离子的不同，将固氮酶主要分为钼铁固氮酶、钒铁固氮酶、铁铁固氮酶以及新型固氮酶。在前三种固氮酶中，结构蛋白和辅因子生物合成的序列具有高度保守性。基因组学研究表明，固氮菌中最小的固氮基因簇保守基因有 *nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifE*、*nifN* 和 *nifB*，通常用 NifH (VnfH 和 AnfH) 以及 NifD (VnfD 和 AnfD) 的氨基酸序列构建进化树。其中钒铁固氮酶和铁铁固氮酶是选择性固氮酶，仅存在于少数的固氮菌中，且选择性固氮酶都是与钼铁固氮酶共存。三种固氮酶中固氮效率最高的是钼铁固氮酶，其次是钒铁固氮酶和铁铁固氮酶。活性固氮酶的生物合成除了催化中心的结构亚基外，还依赖于各种 Nif 蛋白。研究表明至少 9 个 *nif* 基因是合成具有生物活性的固氮酶所必需的：*nifH*、*nifE*、*nifN*、*nifS*、*nifU*、*nifV*、*nifY*、*nifB* 和 *nifQ*，实现氧化还原、电子传递等。

钼-铁固氮酶结构蛋白由钼铁蛋白（固氮酶）和铁蛋白（固氮酶还原酶）组成。铁蛋白是由 *nifH* 基因编码的 γ_2 型同源二聚体。钼铁蛋白是一个有 $\alpha_2\beta_2$ 型的四聚体，由 *nifKD* 基因编码。其中 *nifK* 基因编码 α 亚基，*nifD* 基因编码 β 亚基。NifENXBQV 参与 FeMo-co 的合成以及嵌入；NifMWZ 参与铁蛋白、钼铁蛋白的成熟；NifUS 参与 Fe-S 簇的形成；*nifJF* 基因编码电子传递蛋白，*nifJ* 基因编码铁氧还蛋白，*nifF* 基因编码黄素氧还蛋白将电子传递给钼铁蛋白固氮酶进行固氮反应。

钒-铁固氮酶由 *vnfHDGK* 基因编码，其中固氮酶还原酶由 *vnfH* 基因编码，固氮酶由 *vnfKDG* 基因编码。VnfN、VnfE、VnfX 蛋白参与辅因子的生物合成。

铁-铁固氮酶中，固氮酶还原酶由 *anfH* 基因

编码。固氮酶由 *anfKDG* 基因编码合成的 α 亚基、 β 亚基以及 δ 亚基形成 $\alpha_2\beta_2\delta_2$ 六聚体。VnfN、VnfE、VnfX 蛋白参与辅因子的生物合成。同时，*nifUSVB* 基因也是合成功能性铁-铁固氮酶所必需的。

2.2 多粘类芽孢杆菌固氮基因簇

固氮类芽孢杆菌是类芽孢杆菌属中具有固氮能力的菌株，可以进行自主固氮或者联合固氮。类芽孢杆菌中具有固氮能力的菌种超过 20 个，如多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)、浸麻类芽孢杆菌 (*Paenibacillus macerans*)、固氮类芽孢杆菌 (*Paenibacillus azotofixans*) 等。目前，报道研究最多的模式固氮类芽孢杆菌是多粘类芽孢杆菌。

基因组学分析表明，类芽孢杆菌的固氮基因岛保守而紧凑，保守序列有 *nifB*、*nifH*、*nifD*、*nifK*、*nifE*、*nifN*、*nifX*、*hesA* 和 *nifV* (图 1-A)，是在进化过程中通过水平转移获得^[7]。系统发育树表明类芽孢杆菌的固氮基因岛与弗兰克氏菌的同源性最高，可能来自同一祖先^[8]。在进化过程中，出现固氮基因簇的复制、丢失以及获得多种现象，进一步分化出多个种。

中国农业大学陈三凤教授实验室首先提出类芽孢杆菌具有 δ^{70} 型启动子，启动子区有 GlnR/TnrA 结合位点。并且发现，固氮类芽孢杆菌 GlnR 是氮代谢总调节蛋白，能够与固氮基因启动子结合^[8]。

2.3 施氏假单胞菌固氮基因簇

施氏假单胞菌是目前研究比较深入的联合固氮菌，有 50 kb 左右大小的 *nif* 固氮基因岛，涉及的基因有固氮基因 (*nifQBALHDKENXSUVWZMF*) 和氮代谢调控基因，是生物固氮系统进化中功能和结构完整的中间固氮类型。基因组学分析表明，施氏假单胞菌的固氮基因岛是在进化过程中通过水平转移获得^[6]，且在进化过程中存在固氮基因岛

选择性丢失、复制和重排现象, 并且固氮基因岛的水平获得早于假单胞菌的进化。其中 A1501 和 DSM4166 的固氮基因岛研究比较深入。

A1501 是一株分离自水稻根际的联合固氮菌, 是首例完成全基因组测序的联合固氮菌^[9]: 基因组含有一段 49 kb 大小的包含 59 个基因的固氮基因岛 (图 1-B), 其中 20 个 *nif* 基因 *nifQBALYHDKTYENXUSVWZMF* 构成了典型的固氮基因簇, 对整个固氮过程进行直接调控。*Pseudomonas stutzeri* DSM4166 是一株分离自德国高粱根际土壤的联合固氮菌。目前该菌株的基因组测序工作已经完成^[10], 序列比对分析发现 *nif* 固氮基因岛与 A1501 的固氮基因岛非常相似。

施氏假单胞菌的固氮基因的转录是由 NifL/A 系统调节^[11]。施氏假单胞菌是 δ^{54} 型启动子, NifA 是转录激活因子, NifL 为负调控因子。当外界氧以及固态铵浓度低时, *nifA* 基因正常表达, 开启固氮基因的转录; 当外界氧或者铵浓度高时, NifL 与 NifA 蛋白结合, 抑制固氮基因的表达。

3 固氮基因簇的生物合成学研究进展

提高生物固氮的途径主要有以下三种: (1) 通过修饰固氮微生物与作物之间的共生关系, 让作

物成为固氮细菌的宿主; (2) 将固氮酶基因在植物中表达, 赋予植物自身固氮酶活力; (3) 构建新型的联合固氮工程菌株, 用合成生物学提高联合固氮菌的生物固氮效率。由于联合固氮菌株在作物中的定殖特性, 构建新型高效的联合固氮工程菌株是提高作物利用生物固氮的最有效快捷的路径。

3.1 固氮微生物与作物之间的共生关系

植物与固氮微生物的共生关系研究中, 豆科植物和根瘤菌之间的共生始于双方分泌的信号分子的相互识别: 根瘤菌受到植物来源的类黄酮诱导产生称为 Nod 因子 (Nod factor, NF) 的脂低聚寡糖信号, 之后, NF 被宿主豆类植物根部感知, 使共生反应激活, 产生共生性根瘤器官。王二涛研究员研究团队在该研究领域取得突破性的研究进展: 发现了 SHR-SCR 分子调控模块, 该模块通过决定皮层细胞的命运调控豆科植物根瘤起始的分子机制^[12]。在豆科植物/非豆科植物中过量表达该分子模块可以诱导皮层细胞分裂形成根瘤样结构。同时, 该干细胞分子模块还能被根瘤菌的信号激活, 诱导豆科植物形成根瘤进行共生固氮。该研究结果也为非豆科植物皮层细胞的改造奠定了基础, 提供了新的思路。

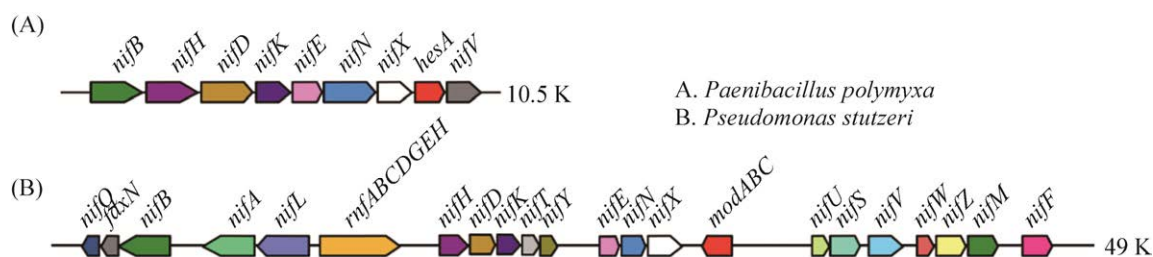


图 1 模式菌株类芽孢杆菌 *Paenibacillus sp. WLY78* (A) 和施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 (B) 中的固氮基因簇

Figure 1. Schematic representation of the *nif* gene island in *Paenibacillus sp. WLY78* (A) and *Pseudomonas stutzeri* A1501 (B).

3.2 固氮酶在植物中的表达

由于固氮酶的复杂性以及氧敏感性, 目前将固氮酶在植物中异源表达具有一定的难度。前期研究表明来自酵母或者植物的铁硫原子簇合成系统能够为固氮酶组分提供[4Fe-4S]的金属原子簇^[13-15], 并且植物体内的电子传递链模块能够分别有效地替代固氮酶系统中负责电子传递的原始模块^[16]。另外, 最小固氮酶的发现以及固氮酶的重构研究^[5,7,17-19], 大大减少了需要导入植物细胞的固氮基因数目。

固氮酶需要大量的能量和低氧环境。由于植物线粒体具有 Fe-S 簇、电子传递链, 消耗氧气并且可以产生大量的 ATP, 因此在植物线粒体内有可能实现生物固氮。研究表明, 固氮基因岛中的 *nif BDEFHJKMNQSUWXYZ* 均能够在线粒体中表达对应的蛋白^[20-21]。但是, 由于固氮酶的复杂性以及现有转基因作物技术的限制, 现有条件下转基因作物中没有检测到固氮酶的活性。

3.3 新型联合固氮微生物的构建

合成生物学的出现和发展为绿色农业的发展带来了新机遇。2012年, Voigt 实验室首先进行了肺炎克氏杆菌固氮基因岛的重构^[22], 表明了合成生物学在生物固氮工程菌株构建的潜力。利用合成生物学的理念和手段, 在作物根部直接构建高效的微生物工厂, 赋予不能进行生物固氮的菌株固氮基因岛, 提高固氮效率, 是有效解决生物固氮的一种简单有效的方法^[23]。目前主要通过以下两个方面实现。

3.3.1 提高固氮酶活性: 通过修饰启动子以及转录调节因子等转录调控元件, 提高现有固氮微生物的固氮效率。陈三凤教授实验室通过启动子替换提高固氮酶活性^[8,24]。将固氮菌株 *Azotobacter chroococcum* 中的负调控因子的 NifL 部分失活同时

组成型表达正调控因子 NifA, 可以使固氮酶活性提高^[25-26]。接种该工程菌株后, 发现小麦在氮缺乏条件下, 与野生型菌株相比较, 工程菌株对小麦的促生能力更强^[26]。将调控因子 NifL 和 RpoN 进行双敲除后, 消除了 NH_4^+ 对固氮酶的抑制作用, 提高固氮酶活性^[27]。

通过固氮基因岛模块替换、重组, 提高固氮酶的活性。铁硫原子簇和电子传递链添加/替换可以提高固氮酶活性^[24]。在大肠杆菌中, 将具有最小固氮基因簇的类芽孢杆菌 WLK78 中固氮基因岛的 9 个基因在大肠杆菌中表达, 固氮酶活性仅达到原菌株的 10%^[24]。分别将类芽孢杆菌 WLK78 或者 *K. oxytoca* 中的铁硫原子簇/电子传递链共表达, 固氮酶活性均能得到提高^[24]。通过模块重组、替换, 将类芽孢杆菌 WLK78 中固氮基因岛与 *K. oxytoca* 的 28 个基因在大肠杆菌中表达, 将固氮酶的活性提高到 50%^[24]。

通过增加固氮基因岛的拷贝数提高固氮酶的活性。

通过外源信号物质调控固氮酶的活性。植物或者微生物分泌的小分子物质可以作为信号提高固氮酶的活性^[27]。通过改变这些信号分子的分泌, 提高固氮酶活性。

3.3.2 在底盘菌中异源表达, 构建新型的联合固氮工程菌株: 根据联合固氮菌株与植物的关系, 人工设计并且构建在植物周围或者内部定殖能力强、次级代谢产物丰富的底盘菌。以此工程菌株为底盘菌, 将固氮基因岛转入并且表达, 构建新型的联合固氮工程菌株^[28-30]。

固氮微生物在土壤中能否固氮, 受土壤类型、土著菌的种类和数量、作物品种等环境的影响, 因此需要因地制宜选择高效广谱的底盘菌构建工

程菌株。在菌株选择方面：首先，选择土壤、体表和根际重要的微生物种群，或者定殖在作物内部的内生菌；此外，该菌株具有构建方便快捷的遗传操作系统的可能性。目前商业应用较广的微生物菌剂主要有芽孢杆菌、假单胞菌和农杆菌等。芽孢杆菌分布广泛、极易分离培养、抗逆性强，并且具有丰富的次级代谢产物，对多种植物病害具有良好的生防效果，是土壤中重要的微生物种群。此外，芽孢杆菌作为生防菌剂加工工艺简单，是一种理想的微生物菌肥。假单胞菌能够在作物周围土壤中大量增殖，具有繁殖速度快、定殖能力强的特点。多种假单胞菌次级代谢产物丰富，具有抑制病害、促进生长的作用，是近年来研究报道最多、最具有防病潜力和应用价值的一类生防菌。因此，可以选择将具有应用价值的生防菌株如假单胞菌和芽孢杆菌作为底盘菌，赋予其生物固氮功能，构建兼具固氮和生防功能的根际微生物细胞工厂，实现化肥农药减施。

张友明教授首创的 Red/ET 重组工程在微生物基因编辑方面有着重要的应用前景。Red/ET 重组工程 (Red/ET recombineering: recombination-mediated genetic engineering) 是利用大肠杆菌细胞内表达的 Red α /Red β 或者 RecE/RecT 重组酶介导的同源重组对 DNA 进行修饰的技术^[31]。该技术在农杆菌、假单胞菌、伯克氏菌以及芽孢杆菌中得到应用^[32-34]。

利用假单胞菌中的 Red/ET 重组系统，将次级代谢产物丰富的根际促生菌 pf-5 作为底盘菌进行改造。首先，将次级代谢产物的负调控基因 *retS* 敲除^[29-30]，以增加次级代谢产物。发酵液 HPLC-MS 数据以及抑菌活性实验表明，次级代谢产物增加且抑菌活性增强^[29-30]。进一步进行粗提物的分离鉴定，发现抑菌活性的增强是因为次级

代谢产物 2,4-DAPG 的产量增加^[30]。直接克隆技术则是利用 RecET 重组酶将基因簇直接从微生物基因组一步克隆到大肠杆菌表达载体上^[35]，利用直接克隆技术一步获得 DSM4166 菌株中完整的固氮基因岛。结合转移转座的技术将固氮基因岛在底盘菌中进行异源表达^[29-30]，用基因组 PCR 的方法在基因水平上对固氮基因岛的水平转移进行验证，同时用乙炔还原法检测固氮酶的活性。实验结果表明固氮基因岛完整地整合到底盘菌中，并且在工程菌株能够检测到固氮酶活性^[29-30,36]。同时，植物表型实验发现，工程菌株中不仅可以通过固氮基因岛促进作物的生长，还可以通过丰富的次级代谢产物增强抑菌活性^[30]。温室实验证明，用微生物处理过的玉米和小麦与用氮肥处理过的玉米和小麦生长得同样好^[37]。

Ryu 等 (2020) 用作物内生菌株 *Rhizobium* sp. IRBG74 为底盘菌，将重构的固氮基因簇导入赋予该菌株固氮酶活性，并且该工程菌株具有较高的耐氧和 NH₄⁺ 的能力^[27]。

4 展望

多年来，生物学家致力于农作物生物固氮的研究，通过改造农作物使之与固氮菌形成类似于根瘤的结构，或者农作物获得外援固氮基因岛直接进行生物固氮。随着研究的深入，豆科植物皮层分化模块的提出以及固氮基因岛的模块替换以及优化，为农作物的生物固氮的实现推进了一大步。

另外，一部分微生物学家通过构建固氮工程菌株达到生物固氮的目的。由于联合固氮微生物在植物根部定殖的特性，工程菌株可以在农作物根部或者内部实现生物固氮。此外，由于微生物丰富的次级代谢产物，“微生物细胞工厂”还可以

实现原位靶向的固氮抑菌等多重功能^[30,38]。因此,构建定殖能力强的底盘菌株,通过模块优化以及替换进行人工重构设计多种生物活性功能,实现多功能智能化的“微生物工厂”。

参考文献

- [1] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 541–556.
- [2] Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 2018, 206: 131–140.
- [3] Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GED, Poole PS, Udvardi MK, Voigt CA, Ané JM, Peters JW. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3698–3710.
- [4] Döbereiner J, Baldani VL. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25(11): 1264–1269.
- [5] Eastman AW, Heinrichs DE, Yuan ZC. Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1–22.
- [6] Venieraki A, Dimou M, Vezyri E, Vamvakas A, Katinaki PA, Chatzipavlidis I, Tampakaki A, Katinakis P. The nitrogen-fixation island insertion site is conserved in diazotrophic *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* sp. isolated from distal and close geographical regions. *PLoS One*, 2014, 9(9): e105837.
- [7] Xie JB, Du ZL, Bai LQ, Tian CF, Zhang YZ, Xie JY, Wang TS, Liu XM, Chen X, Cheng Q, Chen SF, Li JL. Comparative genomic analysis of N₂-fixing and non-N₂-fixing *Paenibacillus* spp.: organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes. *PLoS Genetics*, 2014, 10(3): e1004231.
- [8] Wang LY, Zhang LH, Liu ZZ, Liu ZZ, Zhao DH, Liu XM, Zhang B, Xie JB, Hong YY, Li PF, Chen SF, Dixon R, Li JL. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2013, 9(10): e1003865. DOI:10.1371/journal.pgen.1003865.
- [9] Yan YL, Yang J, Dou YT, Chen M, Ping SZ, Peng JP, Lu W, Zhang W, Yao ZY, Li HQ, Liu W, He S, Geng LZ, Zhang XB, Yang F, Yu HY, Zhan YH, Li DH, Lin ZL, Wang YP, Elmerich C, Lin M, Jin Q. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(21): 7564–7569.
- [10] Yu HY, Yuan ML, Lu W, Yang J, Dai SX, Li Q, Yang ZM, Dong J, Sun LL, Deng ZP, Zhang W, Chen M, Ping SZ, Han YL, Zhan YH, Yan YL, Jin Q, Lin M. Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and rhizosphere-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain DSM4166. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(13): 3422–3423.
- [11] Yan YL, Ping SZ, Peng JP, Han YL, Li L, Yang J, Dou YT, Li Y, Fan HL, Fan Y, Li DH, Zhan YH, Chen M, Lu W, Zhang W, Cheng Q, Jin Q, Lin M. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 1–13.
- [12] Dong WT, Zhu YY, Chang HZ, Wang CH, Yang J, Shi JC, Gao JP, Yang WB, Lan LY, Wang YR, Zhang XW, Dai HL, Miao YC, Xu L, He ZH, Song CP, Wu S, Wang D, Yu N, Wang ET. An SHR–SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation. *Nature*, 2021, 589(7843): 586–590.
- [13] López-Torrejón G, Jiménez-Vicente E, Buesa JM, Hernandez JA, Verma HK, Rubio LM. Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast. *Nature Communications*, 2016, 7: 11426.
- [14] Ivleva NB, Groat J, Staub JM, Stephens M. Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160951. DOI:10.1371/journal.pone.0160951.
- [15] Xiang N, Guo CY, Liu JW, Xu H, Dixon R, Yang JG, Wang YP. Using synthetic biology to overcome barriers to stable expression of nitrogenase in eukaryotic organelles. *PNAS*, 2020, 117(28): 16537–16545.
- [16] Yang JG, Xie XQ, Yang MX, Dixon R, Wang YP. Modular electron-transport chains from eukaryotic organelles function to support nitrogenase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12): E2460–E2465.
- [17] Yang J, Xie X, Wang X, Dixon R, Wang YP. Reconstruction and minimal gene requirements for the alternative iron-only nitrogenase in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2014, 111(35): E3718–E3725. DOI:10.1073/pnas.1411185111.
- [18] Yang JG, Xie XQ, Xiang N, Tian ZX, Dixon R, Wang YP. Polyprotein strategy for stoichiometric assembly of nitrogen

- fixation components for synthetic biology. *PNAS*, 2018, 115(36): E8509-E8517. DOI:10.1073/pnas.1804992115.
- [19] Vicente EJ, Dean DR. Keeping the nitrogen-fixation dream alive. *PNAS*, 2017, 114(12): 3009–3011.
- [20] Allen RS, Tilbrook K, Warden AC, Campbell PC, Rolland V, Singh SP, Wood CC. Expression of 16 nitrogenase proteins within the plant mitochondrial matrix. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 287.
- [21] Okada S, Gregg CM, Allen RS, Menon A, Hussain D, Gillespie V, Johnston E, Byrne K, Colgrave ML, Wood CC. A synthetic biology workflow reveals variation in processing and solubility of nitrogenase proteins targeted to plant mitochondria, and differing tolerance of targeting sequences in a bacterial nitrogenase assay. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 552160. DOI:10.3389/fpls.2020.552160.
- [22] Temme K, Zhao DH, Voigt CA. Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(18): 7085–7090.
- [23] Alori ET, Babalola OO. Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2213. DOI:10.3389/fmicb.2018.02213.
- [24] Li XX, Liu Q, Liu XM, Shi HW, Chen SF. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 43.
- [25] Zhang T, Yan YL, He S, Ping SZ, Alam KM, Han YL, Liu XD, Lu W, Zhang W, Chen M, Xiang WS, Wang XJ, Lin M. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Research in Microbiology*, 2012, 163(5): 332–339.
- [26] Bageshwar UK, Srivastava M, Pardha-Saradhi P, Paul S, Gothandapani S, Jaat RS, Shankar P, Yadav R, Biswas DR, Kumar PA, Padaria JC, Mandal PK, Annapurna K, Das HK. An Environmentally friendly engineered *azotobacter* strain that replaces a substantial amount of urea fertilizer while sustaining the same wheat yield. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(15): e00590–17.
- [27] Ryu MH, Zhang J, Toth T, Khokhani D, Geddes BA, Mus F, Garcia-Costas A, Peters JW, Poole PS, Ané JM, Voigt CA. Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. *Nature Microbiology*, 2020, 5(2): 314–330.
- [28] Geddes BA, Ryu MH, Mus F, Garcia Costas A, Peters JW, Voigt CA, Poole P. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 216–222.
- [29] Yu FN, Jing XS, Li XC, Wang HL, Chen HN, Zhong L, Yin J, Pan D, Yin YL, Fu J, Xia LQ, Bian XY, Tu Q, Zhang YM. Recombineering *Pseudomonas protegens* CHA0: an innovative approach that improves nitrogen fixation with impressive bactericidal potency. *Microbiological Research*, 2019, 218: 58–65.
- [30] Jing XS, Cui QW, Li XC, Yin J, Ravichandran V, Pan D, Fu J, Tu Q, Wang HL, Bian XY, Zhang YM. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(1): 118–133.
- [31] Zhang YM, Muyrers JPP, Testa G, Francis Stewart A. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(12): 1314–1317.
- [32] Hu SB, Fu J, Huang F, Ding XZ, Stewart AF, Xia LQ, Zhang YM. Genome engineering of *Agrobacterium tumefaciens* using the lambda Red recombination system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 2165–2172.
- [33] Wang X, Zhou HB, Chen HN, Jing XS, Zheng WT, Li RJ, Sun T, Liu JQ, Fu J, Huo LJ, Li YZ, Shen YM, Ding XM, Müller R, Bian XY, Zhang YM. Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species. *PNAS*, 2018, 115(18): E4255-E4263. DOI:10.1073/pnas.1720941115.
- [34] Yin J, Zheng WT, Gao YS, Jiang CJ, Shi HB, Diao XT, Li SS, Chen HN, Wang HL, Li RJ, Li AY, Xia LQ, Yin YL, Stewart AF, Zhang YM, Fu J. Single-stranded DNA-binding protein and exogenous RecBCD inhibitors enhance phage-derived homologous recombination in *Pseudomonas*. *iScience*, 2019, 14: 1–14.
- [35] Wang HL, Li Z, Jia RN, Hou Y, Yin J, Bian XY, Li AY, Müller R, Francis Stewart A, Fu J, Zhang YM. RecET direct cloning and Red α recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression. *Nature Protocols*, 2016, 11(7): 1175–1190.
- [36] Setten L, Soto G, Mozzicafreddo M, Fox AR, Lisi C, Cuccioloni M, Angeletti M, Pagano E, Díaz-Paleo A, Ayub ND. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63666.
- [37] Fox AR, Soto G, Valverde C, Russo D, Lagares A, Zorreguieta Á, Alleva K, Pascuan C, Frare R, Mercado-Blanco J, Dixon R, Ayub ND. Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3522–3534.
- [38] Qiu ZG, Egidi E, Liu HW, Kaur S, Singh BK. New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and *in situ* microbiome engineering. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107371.

Advances in synthetic biology of associated nitrogen-fixation bacteria

Xiaoshu Jing^{*}, Yan Ding, Xiaomei Han, Zhe Wang, Deyan Gao

Academy of Grape, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250000, Shandong Province, China

Abstract: Nitrogen is an essential element of life, and is one of the major nutrients limiting plant growth. To meet the increased food production demand in agriculture, chemical nitrogen requirements increase from year to year. Biological nitrogen fixation (BNF) plays an important role in agriculture. More than 60% of the fixed N on earth results from BNF. Associative nitrogen-fixing bacterium in major cereal crops is considered as one alternative in reducing the use of chemical nitrogen fertilizer. There has been a goal to increase biological nitrogen fixation and engineering such associations in non-legume crops to reduce the use of chemically derived fertilizer. The use of synthetic biology tools to boost biological nitrogen fixation has been considered as one of the best strategies to increase crop yield to face population growth and general agronomic crop demand. This review discusses the nitrogen fixation microorganisms, nitrogen-fixation island genes in associative nitrogen-fixing bacterium and nitrogen-fixing mechanisms. This review also elaborates on current research efforts involved in nitrogen fixation using synthetic biology tools. Moreover, this review also proposes new and emerging strategies to improve the nitrogenase activity and future perspectives in this research field.

Keywords: biological nitrogen fixation, synthetic biology, nitrogen-fixation island, associative nitrogen-fixing bacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018BC004), by the Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences-Scientific Research Foundation for High-level Talents (370000219110001113677) and by the Guiding Fundation of Shandong Academy of Grape (SDAG2021B03)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-531-85598057; E-mail: johnycy@126.com

Received: 28 December 2020; Revised: 12 March 2021; Published online: 22 March 2021