

# 大豆斑疹病菌铁摄取因子 PiuB 在致病性中的作用分析

苏如意<sup>1</sup>, 金罗佳<sup>1</sup>, 徐江玲<sup>1</sup>, 耿慧雅<sup>1</sup>, 陈晓<sup>1</sup>, 林思怡<sup>1</sup>, 郭威<sup>1\*</sup>, 纪志远<sup>2\*</sup>

1 浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321004

2 中国农业科学院作物科学研究所 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

苏如意, 金罗佳, 徐江玲, 耿慧雅, 陈晓, 林思怡, 郭威, 纪志远. 大豆斑疹病菌铁摄取因子 PiuB 在致病性中的作用分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 177-189.

SU Ruyi, JIN Luojia, XU Jiangling, GENG Huiya, CHEN Xiao, LIN Siyi, GUO Wei, JI Zhiyuan. The role of iron-uptake factor PiuB in pathogenicity of soybean pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 177-189

**摘要:** 铁作为生命必需的基本元素, 在细菌生长代谢过程中具有重要作用。然而, 大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xag*)中编码铁摄取因子的 *piuB* 基因是否参与病原菌的铁摄取和致病性并不清楚。为解析 PiuB 的作用, 采用同源重组策略获得了 *Xag* 的 *piuB* 基因缺失突变株( $\Delta$ *piuB*), 并对该突变株进行功能研究。研究表明: 相较于野生型, 突变株  $\Delta$ *piuB* 在寄主大豆上的毒性和生长能力显著削弱; 铁载体分泌量激增; 对  $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  的敏感性显著增强。此外, 该突变株的  $H_2O_2$  抗性、胞外多糖产量、生物膜形成能力以及游动性等相较于野生型均显著减弱; 添加外源  $Fe^{3+}$  不能有效恢复  $\Delta$ *piuB* 的上述特性; 功能互补株可完全恢复  $\Delta$ *piuB* 的缺陷性表型至野生型水平。这说明 PiuB 是 *Xag* 摄取  $Fe^{3+}$  的潜在因子, 并且是 *Xag* 在寄主大豆上致病所需的。

**关键词:** 大豆斑疹病菌; 铁摄取因子 PiuB;  $Fe^{3+}$ ; 致病性

资助项目: 浙江省大学生科技创新活动计划(2021R404035, 2023R404037); 浙江省自然科学基金(LY18C140004)

This work was supported by the Scientific and Technological Innovation Activities for Zhejiang Undergraduate (2021R404035, 2023R404037) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY18C140004).

\*Corresponding authors. E-mail: GUO Wei, weiguo817@zjnu.cn; JI Zhiyuan, jizhiyuan@caas.cn

Received: 2023-05-05; Accepted: 2023-09-13; Published online: 2023-09-18

# The role of iron-uptake factor PiuB in pathogenicity of soybean pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

SU Ruyi<sup>1</sup>, JIN Luoja<sup>1</sup>, XU Jiangling<sup>1</sup>, GENG Huiya<sup>1</sup>, CHEN Xiao<sup>1</sup>, LIN Siyi<sup>1</sup>, GUO Wei<sup>1\*</sup>, JI Zhiyuan<sup>2\*</sup>

1 College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

2 National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China

**Abstract:** Iron is an essential element for living organisms that plays critical roles in the process of bacterial growth and metabolism. However, it remains to be elucidated whether *piuB* encoding iron-uptake factor is involved in iron uptake and pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*). To investigate the function of *piuB*, we firstly generated a *piuB* deletion mutant ( $\Delta$ *piuB*) by homologous recombination. Compared with the wild-type, the *piuB* mutant exhibited significantly reduced growth and virulence in host soybean. The mutant displayed markedly increased siderophore secretory volume, and its sensitivity to  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  was significantly enhanced. Additionally, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  resistance, exopolysaccharide yield, biofilm formation, and cell mobility of  $\Delta$ *piuB* were significantly diminished compared to that of the wild-type. The addition of exogenous  $\text{Fe}^{3+}$  cannot effectively restore the above characteristics of  $\Delta$ *piuB*. However, expressing *piuB* *in trans* rescued the properties lost by  $\Delta$ *piuB* to the levels in the wild-type. Taken together, our results demonstrated that PiuB is a potential factor for *Xag* to assimilate  $\text{Fe}^{3+}$ , and is necessary for *Xag* to be pathogenic in host soybean.

**Keywords:** *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; iron-uptake factor PiuB;  $\text{Fe}^{3+}$ ; pathogenicity

由地毯草黄单胞菌大豆致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xag*)引起的大豆细菌性斑疹病(bacterial pustule, BP),是大豆上重要的检疫性病害<sup>[1]</sup>。BP 在我国大豆产区常年发生,区域性和间歇性暴发成灾,其可导致大豆叶片病斑累累、早枯脱落,造成大豆籽粒瘪小、严重减产降质<sup>[2-3]</sup>。

金属离子在细菌生理代谢过程中具有多重作用,其除了参与蛋白质互作、调节蛋白质的三维结构与功能外,还能感知并传递胞外信号、促进生长以及增强毒性<sup>[4]</sup>。 $\text{Fe}^{3+}$ 作为生命必需的基本元素,在细菌呼吸、DNA 合成、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环和氧化还原等过程

中起重要作用;但胞内  $\text{Fe}^{3+}$  积累过量会引发芬顿(Fenton)反应,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累,从而造成细胞中毒或死亡<sup>[5-6]</sup>。因而,病原细菌进化出复杂而又精细的策略调节  $\text{Fe}^{3+}$  的摄取、利用和贮存,以维持胞内的铁稳态<sup>[5,7]</sup>。

有关病原细菌对  $\text{Fe}^{3+}$  摄取的研究相对较少,且主要见于人体和动物病原细菌中。例如,引起一些严重全身感染(如脑膜炎、心内膜炎等)的伴生放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa),可利用 HitABC 系统直接介导  $\text{Fe}^{3+}$  的吸收<sup>[8]</sup>。 $\text{Fe}^{3+}$  膜外受体 PhuR 和 HasR<sup>[9]</sup>,以及受体 FyuA<sup>[10]</sup>,分别在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和鼠疫耶尔森氏杆菌(*Yersinia pestis*)结合铁载体

和铁乳蛋白中发挥重要作用。研究表明,  $Fe^{3+}$  摄取基因缺失通常影响人体或动物病原细菌的毒力<sup>[11-12]</sup>。植物病原黄单胞菌的全基因组内存在多个(7 个以上)注释编码  $Fe^{3+}$  摄取或转运的基因, 但其具体功能均未知。

铁摄取调节子(ferric uptake regulator, Fur)在细菌中高度保守, 且是控制胞内  $Fe^{3+}$  浓度的重要调节子<sup>[13-14]</sup>。在野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc)中, Fur 失活削弱病原菌的铁稳态、氧化应激(oxidative stress, OS)、生长和毒力<sup>[15]</sup>。*P. aeruginosa* 的 fur 为必需基因, 不能直接敲除; 低表达 Fur 菌株在高  $Fe^{3+}$  和低  $Fe^{3+}$  环境中均呈现出生长阻滞现象, 且生物膜(biofilm)形成能力、OS、游动性(motility)等均显著削弱<sup>[16]</sup>。此外, 黄单胞菌铁结合调控子(*Xanthomonas* iron binding regulator, XibR)负调控铁载体产生<sup>[17]</sup>。可见, 植物病原细菌胞内  $Fe^{3+}$  摄取的调控机制复杂且多样。

为探究  $Fe^{3+}$  在 Xag 生长代谢过程中的作用, 本研究以铁摄取因子(iron-uptake factor, PiuB) (A9D66\_21475)为研究对象, 分析 PiuB 对于 Xag

在铁载体分泌量、毒性因子合成、致病性等方面的作用, 以期深入解析 Xag 的致病机制和设计 BP 病害生防策略提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和培养条件

本研究所用菌株和质粒见表 1。

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10; NA 培养基(g/L): 酵母提取物 1, 多聚蛋白胨 5, 蔗糖 10, 牛肉浸膏 3, 琼脂粉 15; NY 培养基(g/L): 酵母提取物 1, 多聚蛋白胨 5; NAN 培养基(g/L): 酵母提取物 1, 牛肉浸膏 3, 多聚蛋白胨 5; NAS 培养基(g/L): 酵母提取物 1, 牛肉浸膏 3, 多聚蛋白胨 5, 蔗糖 100; L 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 5, 葡萄糖 1。大肠杆菌(*Escherichia coli*)于 37 °C 培养; Xag 及衍生菌株于 28 °C 培养。

所用抗生素及浓度: 氨苄青霉素(ampicillin, Ap) 100 μg/mL, 羧苄青霉素(carbenicillin, Cb) 50 μg/mL, 卡那霉素(kanamycin, Km) 50 μg/mL, 壮观霉素(spectinomycin, Sp) 100 μg/mL。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Properties	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Φ90, <i>lacZ</i> Δ <i>m15</i> , <i>recA1</i>	Invitrogen
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ZJ15	Cb <sup>r</sup> ; wild-type, Zhejiang	This lab
Δ <i>hrcC</i>	Cb <sup>r</sup> ; <i>hrcC</i> deletion mutant of ZJ15	This study
Δ <i>piuB</i>	Cb <sup>r</sup> ; <i>piuB</i> deletion mutant of ZJ15	This study
CΔ <i>piuB</i>	Cb <sup>r</sup> and Sp <sup>r</sup> ; Δ <i>piuB</i> harboring pCpiuB	This study
Plasmids		
pMD19-T	Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; pUC <i>ori</i> , cloning vector	TaKaRa
pKMS1	Km <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> <sup>+</sup> , suicide vector derivative from pK18mobGII	[18]
pHM1	Sp <sup>r</sup> ; <i>Mob</i> <sup>+</sup> , <i>LacIP</i> <sup>+</sup> , PK2 replicon, cosmid <sup>f</sup>	[18]
pKΔ <i>piuB</i>	Km <sup>r</sup> ; A 819 bp fusion cloned in pKMS1 for a 2 420 bp deletion in <i>piuB</i>	This study
pCpiuB	Sp <sup>r</sup> ; pHM1 expressing <i>piuB</i> under its own promoter	This study

Ap<sup>r</sup>: Ampicillin resistance; Km<sup>r</sup>: Kanamycin resistance; Sp<sup>r</sup>: Spectinomycin resistance; Cb<sup>r</sup>: Carbenicillin resistance.

## 1.2 *piuB* 基因缺失突变株及其功能互补株的构建

本研究所用引物见表 2。

以 ZJ15 为出发菌株, 以 pKMS1 为敲除载体<sup>[18]</sup>, 基于同源重组策略构建 *piuB* 基因的缺失突变株, 命名为  $\Delta piuB$  (附图 1 已提交至国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0000229); 以 pHM1 为互补载体<sup>[19]</sup>, 构入 *piuB* 基因[含启动子及编码序列(coding sequence, CDS)区], 并将其电转至突变株  $\Delta piuB$  中, 构建突变株  $\Delta piuB$  的功能互补株, 命名为 C $\Delta piuB$  (附图 2 已提交至国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0000229)。

## 1.3 致病性和生长能力测定

将新活化的各待测菌株培养至指数生长期, 用灭菌去离子水洗涤 2 次后, 调至  $OD_{600}=0.3$ , 再加入 0.05% 表面活性剂 Silwet L-77, 混匀后经高压喷雾接种至大豆叶片表面, 15 d 后拍照记录叶片发病症状, 试验重复 3 次。用灭菌去离子水将新培养的各待测菌株调至  $OD_{600}=0.1$ , 经无针注射器注入大豆叶片体内, 每天取注射区域的大豆叶片研磨、稀释、涂布平板, 统计菌落数量以评估各待测菌株在大豆体内的生长能力, 连续测定 7 d, 试验重复 3 次<sup>[2]</sup>。

## 1.4 添加外源 $Fe^{3+}$ 的生长曲线测定

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为

1.0, 按一定比例转接至含不同  $Fe^{3+}$  浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)的 NY 培养基中振荡培养 24 h, 每隔 3 h 测定其  $OD_{600}$  值, 并绘制生长曲线<sup>[16]</sup>。

## 1.5 铁载体分泌量检测

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 等量菌液接种至以铬天青 S 为显色剂的 CAS 检测培养基平板上, 28 °C 培养 3–5 d, 观察接种区域周围培养基的颜色变化, 比较各菌株的铁载体分泌量<sup>[15]</sup>。

## 1.6 $H_2O_2$ 抗性

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 均匀涂布于含不同浓度(0、0.4、0.6 mmol/L)  $Fe^{3+}$  的 NA 平板上, 在平板中央放置 1 个灭菌滤纸片, 在其中滴加 3  $\mu$ L 30% 的  $H_2O_2$  溶液, 28 °C 培养 2 d, 观察各菌株在滤纸片周围所形成的抑菌圈<sup>[19]</sup>。

## 1.7 金属离子抗性

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0, 均匀涂布于 NA 平板上, 再将无菌的圆形滤纸片放置于平板中央, 用移液器在其上分别滴加 3  $\mu$ L  $FeCl_3$  (2.5 mol/L)、 $CuCl_2$  (1.25 mol/L)、 $ZnCl_2$  (1.25 mol/L) 或  $MnCl_2$  (2.5 mol/L) 溶液, 28 °C 培养 2 d, 比较各菌株对金属离子的抗性<sup>[20]</sup>。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>piuB</i> -up-F1	aa <b>TCTAGAGT</b> GAAACGAGCCGACCCTGCC	543
<i>piuB</i> -up-R1	at <b>AAGCTT</b> CAGTGATACCGAGCAGCCAAT	
<i>piuB</i> -down-F2	at <b>AAGCTT</b> GTACTCGGCGACACGCGTCTG	276
<i>piuB</i> -down-R2	ta <b>CTGCAGG</b> GCGAGGATTTATTGATGCGT	
<i>piuB</i> -verification-F1	aa <b>TCTAGAGT</b> GAAACGAGCCGACCCTGCC	819
<i>piuB</i> -verification-R2	ta <b>CTGCAGG</b> GCGAGGATTTATTGATGCGT	
<i>piuB</i> -verification-F3	CTCGCCGTGTTGCTTGACCAG	1 316
<i>piuB</i> -verification-R3	ATGCGAGTTGCCGTTGAGGTG	
<i>piuB</i> -complementation-F	ta <b>AAGCTT</b> GGGGTGCCGTTGCGGTAAAGA	2 869
<i>piuB</i> -complementation-R	at <b>GAATTCT</b> CAGTACACATCGCGTCGATA	

Bold letters indicated restriction sites.

## 1.8 胞外多糖合成

定性测定：将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0，用灭菌去离子水洗涤菌体并悬浮，取 1  $\mu$ L 菌液接种于含 2% 葡萄糖或蔗糖的 NY 平板上，28  $^{\circ}$ C 培养 5–7 d，观察各菌株的生长形态<sup>[1]</sup>。

定量测定：将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0，取 20  $\mu$ L 菌液接种于含 2% 葡萄糖或蔗糖的 NY 液体培养基中，28  $^{\circ}$ C 振荡培养 5 d，离心收集上清液，加入 3 倍体积无水乙醇后充分混匀，-20  $^{\circ}$ C 放置 10–12 h，高速离心收集沉淀物，于 55  $^{\circ}$ C 烘干后称重<sup>[1]</sup>。

## 1.9 生物膜检测

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0，按 1% 比例转接至 L 培养基中，28  $^{\circ}$ C 静置培养 7 d 后，轻轻倒去培养液，先用 0.1% 结晶紫对试管壁上形成的生物膜染色，再用 90% 酒精溶解结合于生物膜上的结晶紫，分别测定结晶紫洗脱液  $A_{600}$  和上清液  $OD_{600}$  的吸光值，确定各菌株的生物膜形成能力<sup>[16]</sup>。

## 1.10 游动性测定

将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 1.0，用灭菌去离子水洗涤菌体并重悬至  $OD_{600}$  约为 0.1，取 1  $\mu$ L 菌液接种于含 0.5% 葡萄糖的半固体 NY 平板上，28  $^{\circ}$ C 培养 1–2 d，比较各菌株在平板上的游动能力<sup>[19]</sup>。

## 1.11 胞外水解酶检测

分别以羧甲基纤维素、可溶性淀粉或脱脂牛奶为底物制备胞外酶活性检测培养基。将新活化的各待测菌株培养至  $OD_{600}$  约为 3.0，离心取上清液并加入各酶活性检测平板中，培养 1–2 d 后分别染色，并测量水解圈直径，比较各菌株的胞外水解酶活性<sup>[3]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 PiuB 在植物病原黄单胞菌中高度保守

*piuB* 在 *Xag* 基因组内注释为编码铁摄取因

子，暗示其可能是胞内的  $Fe^{3+}$  吸收因子。在已知序列的 *Xag* 菌株(如 ZJ15、12-2 和 8ra 等)中，*PiuB* 具有 100% 的蛋白序列同源性。此外，*Xag* 的 *piuB* 基因与来自柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xac*) 306 菌株的 *piuB* 基因(*XAC4036*)、棉花细菌性角斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xcm*) AR810009 菌株的 *piuB* 基因(*CIW71\_02020*)、菜豆细菌性疫病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xcp*) CFBP4885 菌株的 *piuB* 基因(*XcfCFBP4885P\_00310*)、辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 85-10 菌株的 *piuB* 基因(*XCV4128*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) PXO99<sup>A</sup> 菌株的 *piuB* 基因(*PXO\_02819*)、水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) BLS256 菌株的 *piuB* 基因(*XOC\_4335*)、*Xcc* 8004 菌株的 *piuB* 基因(*XC\_4044*)和小麦细菌性条斑病菌(*Xanthomonas translucens* pv. *cerealis*, *Xtc*) CFBP 2541 菌株的 *piuB* 基因(*KHA79\_01495*)，分别具有 99.33%、99.33%、96.57%、95.40%、90.73%、90.65%、78.39% 和 71.40% 的 DNA 序列相似性(图 1)。揭示铁摄取因子 *PiuB* 在植物病原黄单胞菌中高度保守。

## 2.2 PiuB 失活削弱大豆斑疹病菌在寄主大豆上的致病性

为探究 *PiuB* 是否参与 *Xag* 的致病性，分别将  $\Delta$ *piuB*、 $C\Delta$ *piuB* 和野生型菌株通过喷雾和无针注射方式接种至寄主大豆叶片上。15 d 后， $\Delta$ *piuB* 在大豆叶片表面引起的疱疹状病斑(毒性)明显弱于野生型，而 III 型分泌系统突变株  $\Delta$ *hrcC* (阴性对照)在大豆叶片上没有产生任何病斑症状(图 2A)。此外， $\Delta$ *piuB* 在大豆叶片体内的生长能力前 7 d 均显著低于野生型( $P < 0.01$ ) (图 2B)。功能互补可恢复  $\Delta$ *piuB* 在寄主大豆上的毒性和生长能力至野生型水平(图 2)。这说明 *PiuB* 是 *Xag* 在寄主大豆上致病所需的。

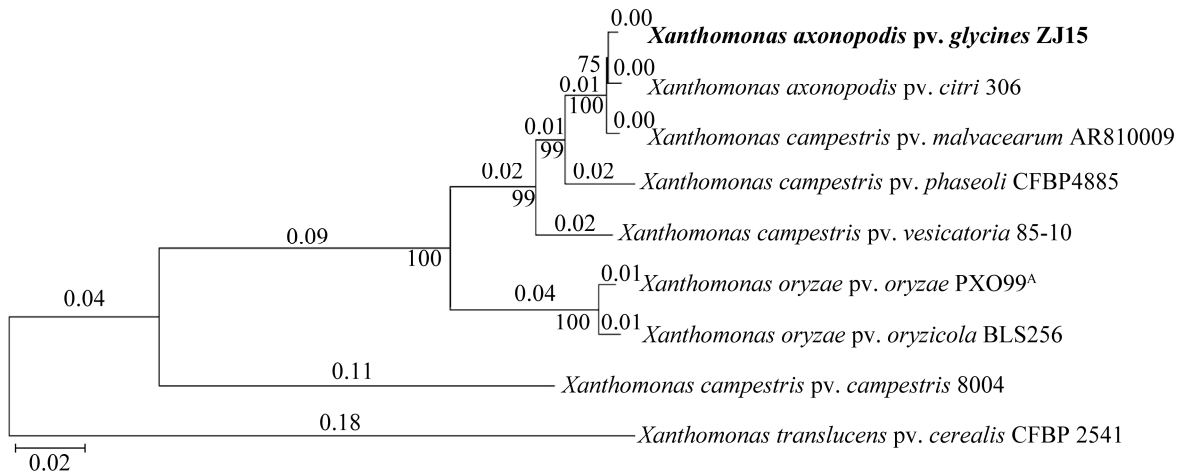


图1 *piuB* 基因在植物病原黄单胞菌中的同源性分析 通过MEGA 7.0软件利用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 并且用 bootstrap-1 000 进行校正

Figure 1 Homology analysis of *piuB* in plant pathogenic *Xanthomonas* spp.. Phylogenetic tree was constructed using NJ through MEGA 7.0 software, and was corrected with bootstrap-1 000.

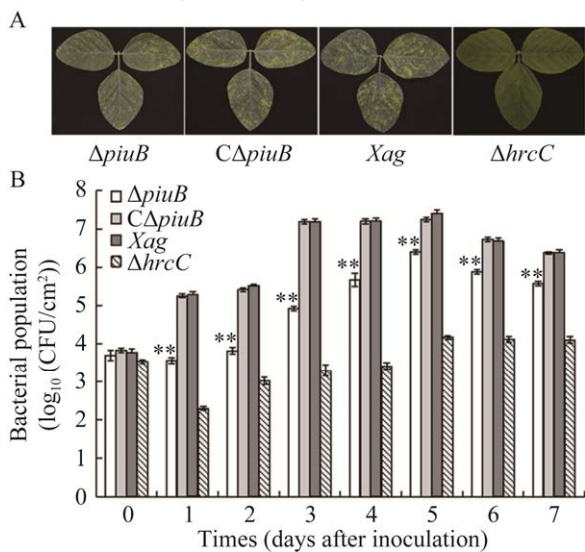


图2 大豆斑疹病菌突变株  $\Delta piuB$  在寄主大豆上的致病性测定 A: 突变株  $\Delta piuB$  在大豆叶片上引起的病害症状. B: 突变株  $\Delta piuB$  在大豆叶片体内的生长能力. \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  检验)

Figure 2 Pathogenicity test of  $\Delta piuB$  in host soybean. A: BP symptoms caused by  $\Delta piuB$  on soybean leaves. B: Growth ability of  $\Delta piuB$  in inoculated leaves of soybean. \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  test).

### 2.3 *PiuB* 失活导致大豆斑疹病菌铁载体分泌量激增

为初步探究 *PiuB* 是否与 *Xag* 摄取外源  $Fe^{3+}$

有关, 分别检测  $\Delta piuB$ 、 $C\Delta piuB$  和野生型菌株的铁载体分泌量。在以铬天青 S 为显色剂的 CAS 检测培养基平板上, 上述 3 个菌株均能产生较明显的淡黄色晕圈, 表明各菌株均能产生铁载体以螯合培养基中的  $Fe^{3+}$ , 使培养基呈现出黄色; 但突变株  $\Delta piuB$  形成黄色晕圈的能力相较于  $C\Delta piuB$  及野生型菌株均显著增强 ( $P<0.01$ ) (图 3)。在  $Fe^{3+}$  充足条件下,  $\Delta piuB$  需分泌更多的铁载体从胞外吸收  $Fe^{3+}$ ; 也就是说 *piuB* 基因缺失增强了 *Xag* 的铁载体分泌量, 表明 *PiuB* 可能是 *Xag* 获取  $Fe^{3+}$  所需的。

### 2.4 *PiuB* 维持大豆斑疹病菌体内的铁稳态

为探究 *PiuB* 失活是否影响 *Xag* 胞内的渗透平衡, 分别测定  $\Delta piuB$ 、 $C\Delta piuB$  及野生型菌株在添加不同浓度外源  $Fe^{3+}$  条件下的生长能力。试验结果发现, 在培养基中添加适量  $Fe^{3+}$  (0.4 mmol/L) 时,  $\Delta piuB$  菌株的生长活力达到最大, 与  $C\Delta piuB$  及野生型菌株的生长能力基本一致; 然而, 在培养基中添加低浓度  $Fe^{3+}$  (<0.4 mmol/L) 或高浓度  $Fe^{3+}$  (>0.4 mmol/L) 时,  $\Delta piuB$  菌株的生长活力相较于  $C\Delta piuB$  和野生型菌株均受到明显抑制 (图 4)。说明 *PiuB* 维持 *Xag* 体内的铁稳态。

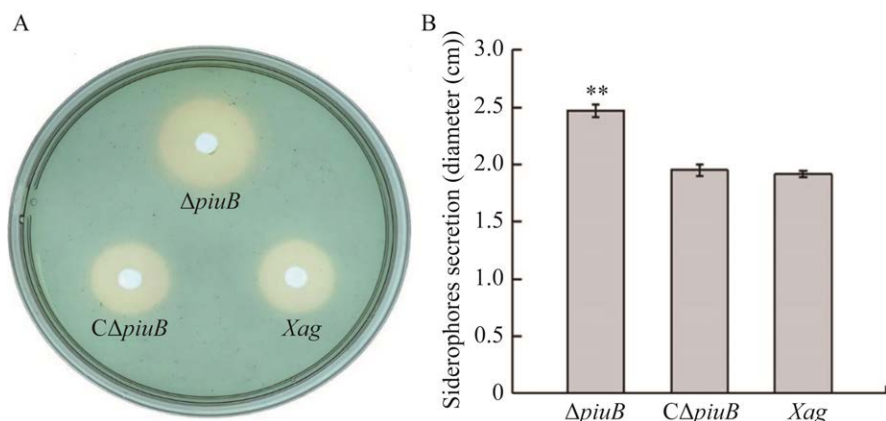


图3 突变株  $\Delta piuB$  的铁载体分泌量分析 A: 在 CAS 检测培养基平板上测定突变株  $\Delta piuB$  的铁载体分泌量. B: 突变株  $\Delta piuB$  铁载体分泌形成的黄色晕圈直径. 晕圈直径与铁载体分泌量呈正相关. \*\*:  $P < 0.01$ ;  $n = 3$  ( $t$  检验)

Figure 3 Analysis of siderophore secretory volume in  $\Delta piuB$ . A: Determination of siderophore secretory volume in  $\Delta piuB$  on CAS detection medium plates. B: Diameter of yellow halo zone formed by siderophore secretion in  $\Delta piuB$ . The diameter of yellow halo zone is proportional to the siderophore secretory volume. \*\*:  $P < 0.01$ ;  $n = 3$  ( $t$  test).

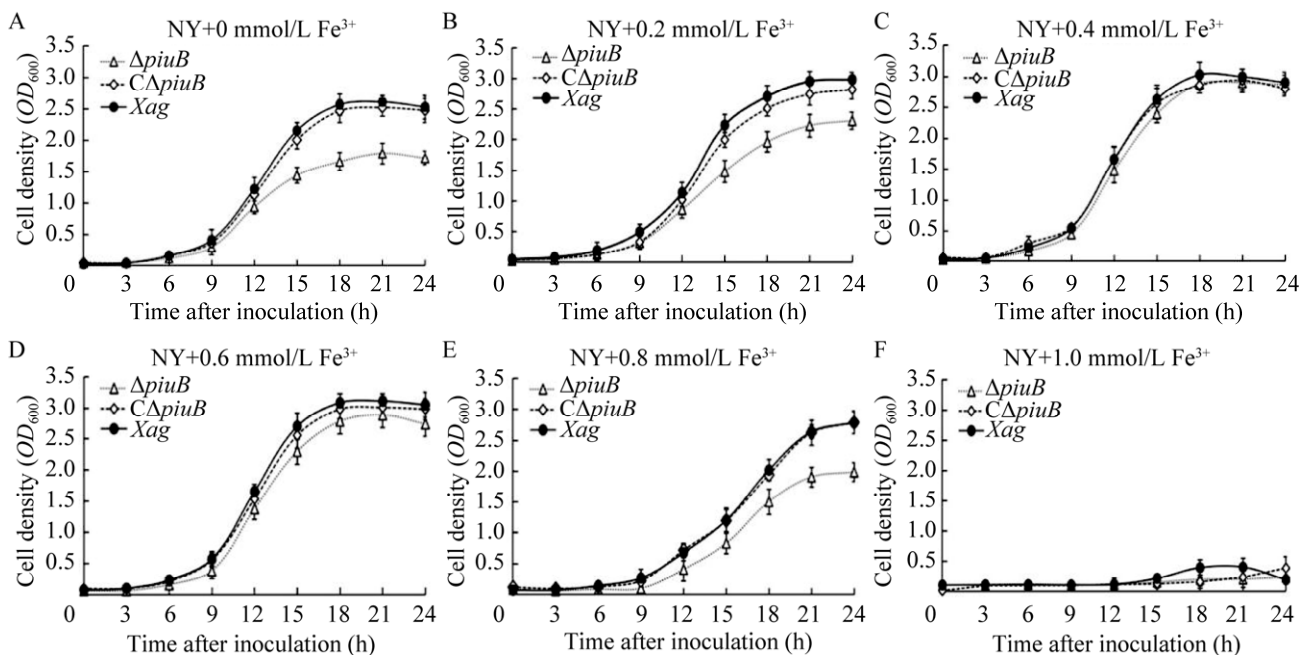


图4 在添加不同浓度的外源  $Fe^{3+}$  条件下突变株  $\Delta piuB$  的生长曲线 将突变株  $\Delta piuB$  接种至含不同浓度  $Fe^{3+}$  的 NY 培养基中振荡培养 24 h, 每 3 h 测定一次菌株浓度. A: 0 mmol/L  $Fe^{3+}$ . B: 0.2 mmol/L  $Fe^{3+}$ . C: 0.4 mmol/L  $Fe^{3+}$ . D: 0.6 mmol/L  $Fe^{3+}$ . E: 0.8 mmol/L  $Fe^{3+}$ . F: 1.0 mmol/L  $Fe^{3+}$ .  $n = 3$

Figure 4 Growth curve of  $\Delta piuB$  under the addition of different concentrations of exogenous  $Fe^{3+}$ .  $\Delta piuB$  was inoculated into NY medium containing different concentrations of  $Fe^{3+}$  for shaking culture, and the  $OD_{600}$  of  $\Delta piuB$  was measured every 3 h for 24 h. A: 0 mmol/L  $Fe^{3+}$ . B: 0.2 mmol/L  $Fe^{3+}$ . C: 0.4 mmol/L  $Fe^{3+}$ . D: 0.6 mmol/L  $Fe^{3+}$ . E: 0.8 mmol/L  $Fe^{3+}$ . F: 1.0 mmol/L  $Fe^{3+}$ .  $n = 3$ .

## 2.5 PiuB 失活增强大豆斑疹病菌对 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$ 的敏感性

为探究 *piuB* 基因缺失是否影响 *Xag* 对金属离子的敏感性, 分别检测  $\text{Fe}^{3+}$  (2.5 mol/L)、 $\text{Cu}^{2+}$  (1.25 mol/L)、 $\text{Zn}^{2+}$  (1.25 mol/L) 和  $\text{Mn}^{2+}$  (2.5 mol/L) 对  $\Delta\text{piuB}$ 、 $\text{C}\Delta\text{piuB}$  及野生型菌株的抑制能力。在 NA 测定平板上,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  对  $\Delta\text{piuB}$ 、 $\text{C}\Delta\text{piuB}$  及野生型菌株均能产生较明显的抑菌圈; 但是, 上述 4 种金属离子对  $\Delta\text{piuB}$  菌株的抑制能力相较于  $\text{C}\Delta\text{piuB}$  和野生型菌株均显著增强(图 5)。表明 PiuB 失活可增强 *Xag* 对  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  的敏感性。

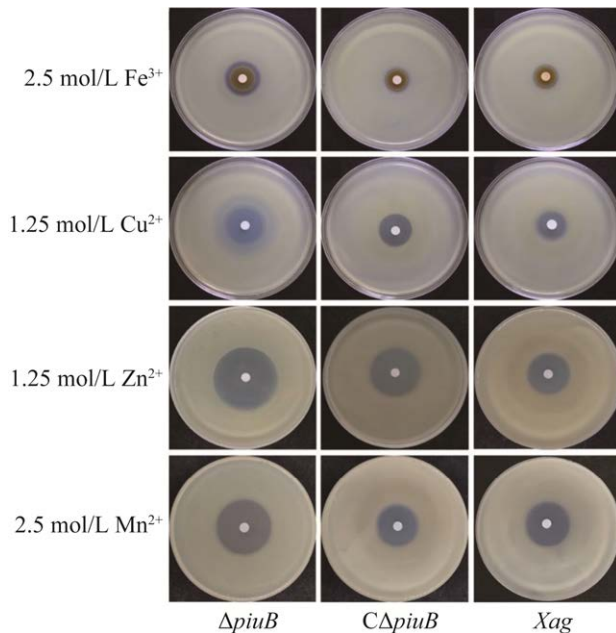


图 5 突变株  $\Delta\text{piuB}$  对  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  的灵敏性测定 在 NA 测定平板上, 各金属离子浓度分别为  $\text{Fe}^{3+}$  (2.5 mol/L)、 $\text{Cu}^{2+}$  (1.25 mol/L)、 $\text{Zn}^{2+}$  (1.25 mol/L) 和  $\text{Mn}^{2+}$  (2.5 mol/L)

Figure 5 Determination of sensitivity of  $\Delta\text{piuB}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . In NA determination plates, the concentrations of each metal ions are  $\text{Fe}^{3+}$  (2.5 mol/L),  $\text{Cu}^{2+}$  (1.25 mol/L),  $\text{Zn}^{2+}$  (1.25 mol/L), and  $\text{Mn}^{2+}$  (2.5 mol/L), respectively.

## 2.6 PiuB 失活削弱大豆斑疹病菌对氧化应激的抗性

为探究 PiuB 失活是否影响 *Xag* 抵抗氧化应激的能力, 分别检测  $\Delta\text{piuB}$ 、 $\text{C}\Delta\text{piuB}$  及野生型菌株对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的敏感性。在 NA 检测平板上,  $\text{H}_2\text{O}_2$  对  $\Delta\text{piuB}$ 、 $\text{C}\Delta\text{piuB}$  及野生型菌株均能产生较明显的抑菌圈; 但是,  $\text{H}_2\text{O}_2$  对  $\Delta\text{piuB}$  菌株的抑制能力相较于  $\text{C}\Delta\text{piuB}$  和野生型菌株明显增强(图 6)。在添加不同浓度的外源  $\text{Fe}^{3+}$  条件下,  $\text{Fe}^{3+}$  在一定程度上略微增强了  $\Delta\text{piuB}$  菌株对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的敏感性(图 6)。揭示 PiuB 失活削弱了 *Xag* 对氧化应激的抗性。

## 2.7 PiuB 是大豆斑疹病菌合成胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 所需的

为探究 PiuB 失活是否影响 *Xag* 的 EPS 合成, 分别将  $\Delta\text{piuB}$ 、 $\text{C}\Delta\text{piuB}$  及野生型菌株接种至含 2% 葡萄糖或蔗糖的 NY 培养基中, 对其 EPS 产量进行定性/定量分析。试验结果显示: 无论是否在测定平板上添加外源  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\Delta\text{piuB}$  所形

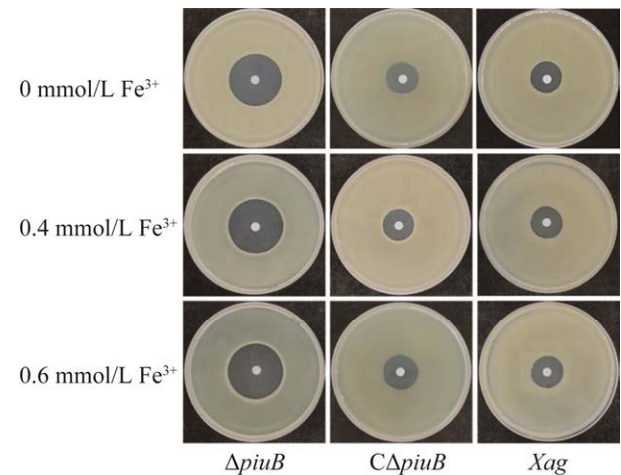


图 6 在添加不同浓度的外源  $\text{Fe}^{3+}$  条件下突变株  $\Delta\text{piuB}$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  抗性的测定 在 NA 测定平板上, 所用氧化剂为 30% 过氧化氢

Figure 6  $\text{H}_2\text{O}_2$  resistance of  $\Delta\text{piuB}$  was determined under different concentrations of exogenous  $\text{Fe}^{3+}$ . In NA determination plates, the oxidant used was 30% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).



成的菌落相较于  $C\Delta piuB$  和野生型菌株均明显减小; 而且各菌株所形成的菌落均伴随着外源  $Fe^{3+}$  浓度的增加而逐渐变小(图 7A), 暗示 *piuB* 基因突变可能削弱 *Xag* 的 EPS 合成。为精准评估突变株  $\Delta piuB$  的 EPS 产量, 液体培养后提取 EPS

称重, 发现  $\Delta piuB$  菌株的 EPS 产量相较于  $C\Delta piuB$  和野生型菌株显著减少( $P<0.01$ ); 但无论是否添加外源  $Fe^{3+}$ , 各菌株的 EPS 产量变化不大(图 7B)。表明 *PiuB* 是 *Xag* 合成 EPS 所需的; 且适量添加外源  $Fe^{3+}$  不影响 *Xag* 的 EPS 产量。

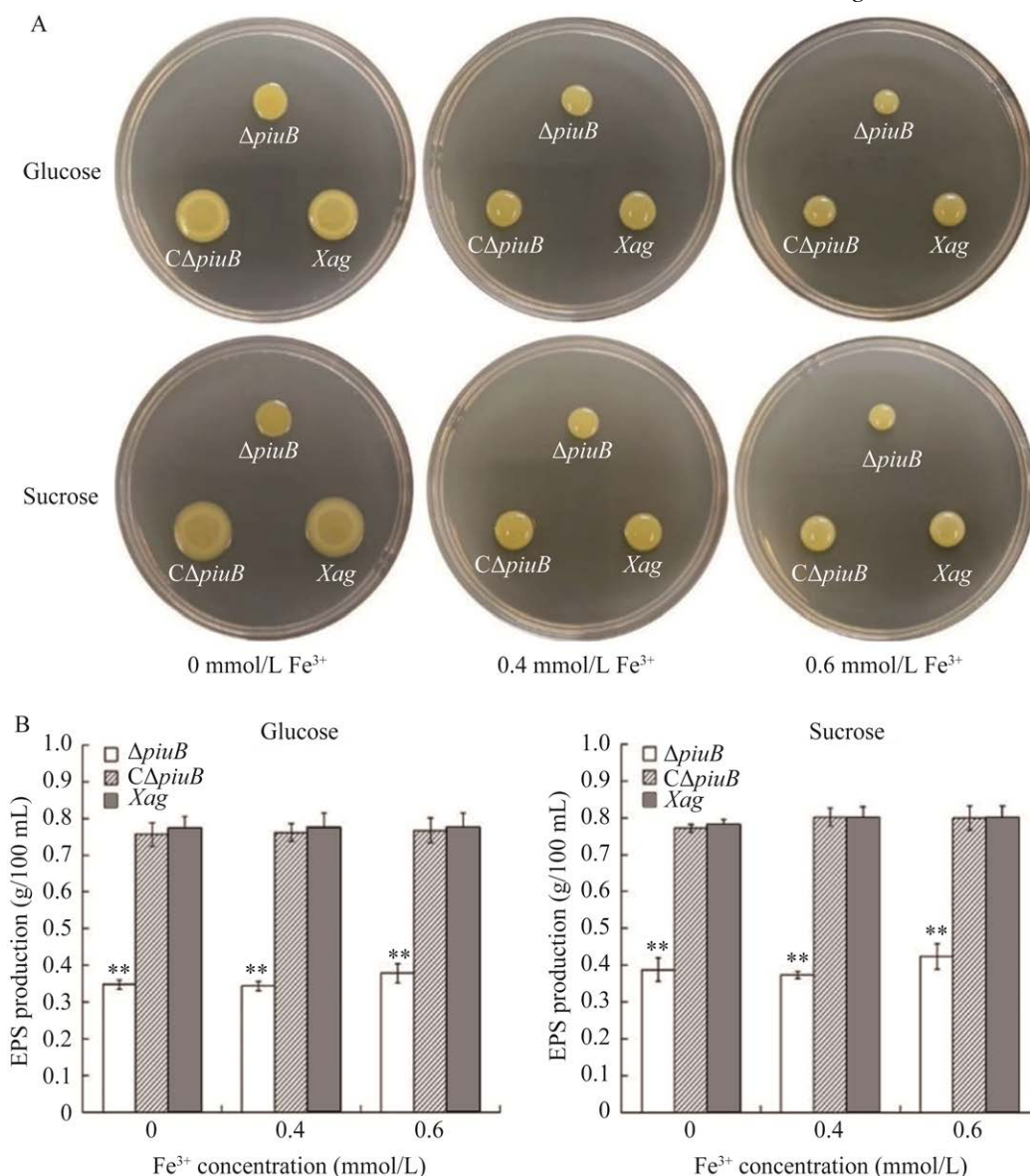


图 7 在添加不同浓度的外源  $Fe^{3+}$  条件下突变株  $\Delta piuB$  合成 EPS 的产量 在含 2%葡萄糖或蔗糖的 NY 平板或液体培养基中, 定性/定量测定突变株  $\Delta piuB$  的 EPS 产量. A: 定性测定 EPS 的产量. B: 定量测定 EPS 的产量. \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  检验)

Figure 7 EPS yield of  $\Delta piuB$  under the condition of adding different concentrations of exogenous  $Fe^{3+}$ . EPS production was detected on NY plates or liquid medium supplemented with 2% glucose or sucrose. A: Qualitative determination of EPS production. B: Quantitative determination of EPS production. \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  test).

## 2.8 PiuB 失活削弱大豆斑疹病菌的生物膜形成能力

为探究 PiuB 失活是否影响 *Xag* 的生物膜形成, 分别检测  $\Delta piuB$ 、 $C\Delta piuB$  和野生型菌株的生物膜形成能力。在 L 测定培养基中,  $\Delta piuB$  菌株形成生物膜的能力相较于  $C\Delta piuB$  及野生型菌株均显著减弱( $P<0.01$ ) (图 8)。在添加不同浓度的外源  $Fe^{3+}$  条件下,  $\Delta piuB$  菌株形成生物膜的能力略有增强, 但是仍显著低于  $C\Delta piuB$  及野生型菌株的形成水平( $P<0.01$ ) (图 8)。这说明 PiuB 失活显著削弱 *Xag* 的生物膜形成能力; 但适量添加外源

$Fe^{3+}$  可少许提升  $\Delta piuB$  菌株的生物膜形成能力。

## 2.9 PiuB 失活削弱大豆斑疹病菌的游动性

为探究 PiuB 失活是否影响 *Xag* 的游动性, 分别测定  $\Delta piuB$ 、 $C\Delta piuB$  及野生型菌株在 NY 半固体培养基平板上的游动能力。根据试验结果可知, 无论是否添加外源  $Fe^{3+}$ ,  $\Delta piuB$  菌株的游动能力相较于  $C\Delta piuB$  和野生型菌株明显减弱 (图 9)。此外, 各菌株的游动能力会伴随着外源  $Fe^{3+}$  浓度的增加而逐渐减弱 (图 9)。说明 PiuB 失活削弱 *Xag* 的游动性; 而且添加外源  $Fe^{3+}$  在一定程度上减弱了 *Xag* 的游动性。

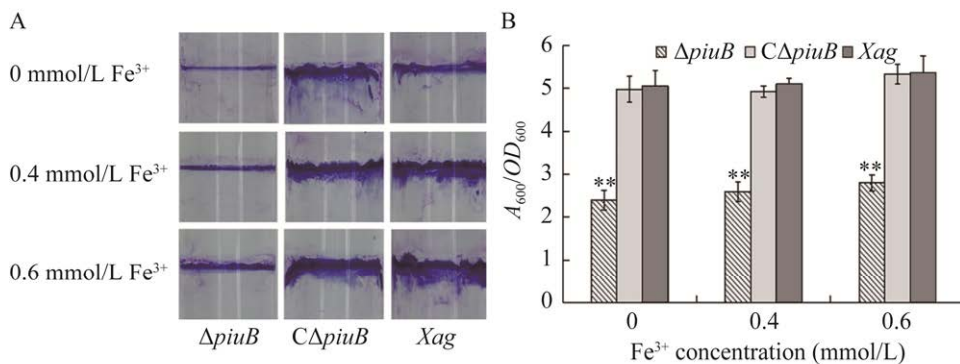


图 8 在添加不同浓度的外源  $Fe^{3+}$  条件下突变株  $\Delta piuB$  形成生物膜的能力 在 L 液体培养基中, 检测突变株  $\Delta piuB$  的生物膜形成. A: 用 0.1% 结晶紫染色结合于玻璃管壁上的生物膜. B: 用  $A_{600}/OD_{600}$  比值量化生物膜. \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  检验)

Figure 8 The ability of  $\Delta piuB$  to form biofilm under different concentrations of exogenous  $Fe^{3+}$ . Biofilm formation of  $\Delta piuB$  was detected in L liquid medium. A: The glass-bound biofilm was stained with 0.1% crystal violet. B: The biofilm is quantified as  $A_{600}/OD_{600}$ . \*\*:  $P<0.01$ ;  $n=3$  ( $t$  test).

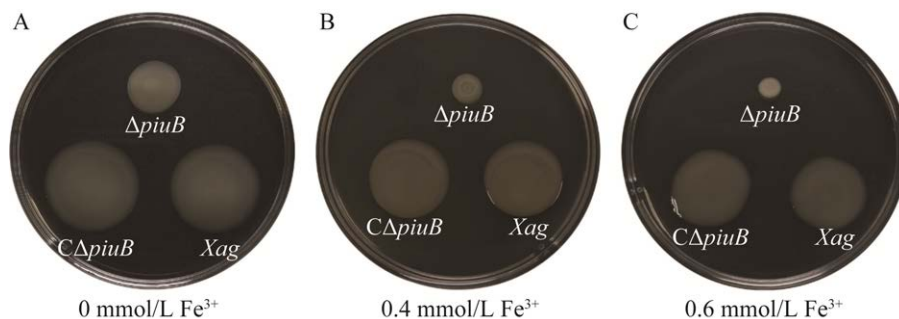


图 9 在添加不同浓度的外源  $Fe^{3+}$  条件下突变株  $\Delta piuB$  的游动性测定 在含 0.5% 葡萄糖的 NY 半固体平板上, 测定突变株  $\Delta piuB$  的游动能力. A: 0 mmol/L  $Fe^{3+}$ . B: 0.4 mmol/L  $Fe^{3+}$ . C: 0.6 mmol/L  $Fe^{3+}$

Figure 9 Determination of cell motility in  $\Delta piuB$  under different concentrations of exogenous  $Fe^{3+}$ . Motility was detected on NY semi-solid plates supplemented with 0.5% glucose. A: 0 mmol/L  $Fe^{3+}$ . B: 0.4 mmol/L  $Fe^{3+}$ . C: 0.6 mmol/L  $Fe^{3+}$ .

### 3 讨论与结论

Fe<sup>3+</sup>在病原细菌与寄主植物互作过程中至关重要,其缺乏会影响病原菌的生长活力和致病力<sup>[21-22]</sup>。对于植物病原细菌来说,寄主体内形成的缺铁环境会阻碍病原菌的侵入<sup>[23]</sup>。为打破宿主体内的 Fe<sup>3+</sup>限制,病原菌进化出一套精密且复杂的 Fe<sup>3+</sup>摄取和调控系统<sup>[24]</sup>。分泌铁载体是病原细菌摄取外源 Fe<sup>3+</sup>的重要途径<sup>[25]</sup>。在缺铁条件下,一些病原细菌可合成并分泌一种高亲和 Fe<sup>3+</sup>的低分子量化合物(俗称铁载体),可协助其从胞外螯合 Fe<sup>3+</sup>供给受体细胞<sup>[26]</sup>。研究表明, PiuB 是 *Xag* 摄取 Fe<sup>3+</sup>的潜在因子,其失活不仅导致菌株的铁载体分泌量激增;而且也增强菌株对 Fe<sup>3+</sup>的敏感性。与其他植物病原黄单胞菌(如 *Xcc*)类似, Fe<sup>3+</sup>在 *Xag* 的生长过程中起重要作用,但适度的 Fe<sup>3+</sup>浓度方可使突变株  $\Delta$ *piuB* 正常生长,表明 *Xag* 具有精准且灵敏的 Fe<sup>3+</sup>摄取和贮藏系统。其是否通过 Fur 抑制或者激活 *piuB* 基因的转录,严格调控以维持胞内 Fe<sup>3+</sup>浓度的稳态,有待进一步探究。遗憾的是,一直未能获得 *fur* 基因缺失突变株,暗示 *fur* 可能是 *Xag* 的必需基因。

铁稳态在病原细菌抗氧化应激中起重要作用<sup>[27-28]</sup>。最新研究发现, Fe<sup>3+</sup>摄取调节子 Fur 可调节 *P. aeruginosa* 的超氧化物歧化酶 SodB 和过氧化物酶 KatG 等,在应对氧化应激时发挥作用<sup>[29]</sup>。研究表明, PiuB 失活导致 *Xag* 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抗性减弱,即抗氧化应激功能下降,这可能与突变株  $\Delta$ *piuB* 依赖于 Fe<sup>3+</sup>浓度的生长活力及 Fe<sup>3+</sup>获取有关。推测植物病原细菌在应对氧化应激时可能启动类似的依赖于 Fe<sup>3+</sup>浓度的调节通路。PiuB 失活导致 *Xag* 的 EPS 产量减少、生物膜形成受阻,添加外源 Fe<sup>3+</sup>仅可少恢复生物膜形成能力。但即使外源添加 Fe<sup>3+</sup>恢复突变菌株生长,

也无法提高其 EPS 产量。Fe<sup>3+</sup>浓度作为一种信号可调控病原细菌的生物膜形成,外源添加适宜浓度的 Fe<sup>3+</sup>可促进某些病原菌形成生物膜<sup>[30]</sup>;内源性 Fe<sup>3+</sup>缺失则使生物膜无法正常形成<sup>[31]</sup>。PiuB 失活削弱 *Xag* 的生物膜形成,除了源于菌株的 EPS 产量减少<sup>[32]</sup>,还可能受制于低效的 Fe<sup>3+</sup>摄取<sup>[33]</sup>。据报道, EPS 和生物膜可抵御胞外环境压力<sup>[34]</sup>,减弱的 EPS 合成和生物膜形成,在一定程度上或许增强了菌株对胞外环境中高浓度金属离子的敏感性。

PiuB 失活削弱了 *Xag* 在寄主大豆上的生长能力和致病性。一方面,可能源于 *piuB* 基因突变导致菌株的 EPS 合成、生物膜形成、游动性和淀粉酶活性减少(附图 3 已提交至国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0000229);另一方面, *Xag* 侵染瞬间可引发寄主体内的 ROS 暴发<sup>[35]</sup>, PiuB 失活使得突变株的抗氧化应激能力削弱,可能弱化了病原菌在大豆体内的定殖和生长能力,使其致病性下降。PiuB 是否还有其他生物学功能,尤其在 Fe<sup>3+</sup>摄取和致病性等方面,仍需进一步研究。

综上所述, PiuB 在 *Xag* 的生长代谢、致病性等方面至关重要。PiuB 是 *Xag* 摄取 Fe<sup>3+</sup>的潜在因子,其失活使突变株因 Fe<sup>3+</sup>摄取能力受阻而引发一系列的生物学特性改变,如铁载体分泌量激增、抗氧化应激功能下降、生长迟滞、毒性因子合成受阻和致病性削弱等。该研究将增加对 *Xag* 在寄主大豆上致病机制的认知,可为 BP 病害的生物防治开拓新途径。

### REFERENCES

- [1] GUO W, GAO J, WANG HJ, SU RY, SUN CY, GAO SH, LIU JZ, CHEN GY. Phosphoglycerate kinase is involved in carbohydrate utilization, extracellular polysaccharide biosynthesis, and cell motility of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* independent of

- Clp[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 91.
- [2] CHATNAPARAT T, PRATHUANGWONG S, IONESCU M, LINDOW SE. XagR, a LuxR homolog, contributes to the virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* to soybean[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2012, 25(8): 1104-1117.
- [3] 苏如意, 王宏杰, 戴潇雨, 高思涵, 王卿怡, 冯超颖, 张萍华, 郭威. 大豆斑疹病菌胞外纤维素酶编码基因的鉴定及其调控分析[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(3): 292-300.
- SU RY, WANG HJ, DAI XY, GAO SH, WANG QY, FENG CY, ZHANG PH, GUO W. Identification and regulation analysis of genes encoding extracellular cellulase in soybean pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(3): 292-300 (in Chinese).
- [4] BEGG SL. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 77-87.
- [5] XING YY, XU N, BHANDARI DD, LAPIN D, SUN XH, LUO XM, WANG YQ, CAO JD, WANG HB, COAKER G, PARKER JE, LIU J. Bacterial effector targeting of a plant iron sensor facilitates iron acquisition and pathogen colonization[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(6): 2015-2031.
- [6] TROXELL B, HASSAN HM. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 59.
- [7] RATLEDGE C, DOVER LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 881-941.
- [8] RHODES ER, MENKE S, SHOEMAKER C, TOMARAS AP, MCGILLIVARY G, ACTIS LA. Iron acquisition in the dental pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: what does it use as a source and how does it get this essential metal?[J]. *BioMetals*, 2007, 20(3): 365-377.
- [9] SMITH AD, WILKS A. Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(12): 7756-7766.
- [10] CHEN YL, SONG K, CHEN X, LI Y, LV RC, ZHANG QW, CUI YJ, BI YJ, HAN YP, TAN YF, DU ZM, YANG RF, QI ZZ, SONG YJ. Attenuation of *Yersinia pestis* *fyuA* mutants caused by iron uptake inhibition and decreased survivability in macrophages[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 874773.
- [11] ANDREWS-POLYMENIS HL, BÄUMLER AJ, MCCORMICK BA, FANG FC. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(6): 2356-2369.
- [12] CASSAT JE, SKAAR EP. Iron in infection and immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 13(5): 509-519.
- [13] DAVIES BW, BOGARD RW, MEKALANOS JJ. Mapping the regulon of *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator expands its known network of gene regulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(30): 12467-12472.
- [14] PANDEY SS, PATNANA PK, LOMADA SK, TOMAR A, CHATTERJEE S. Co-regulation of iron metabolism and virulence associated functions by iron and XibR, a novel iron binding transcription factor, in the plant pathogen *Xanthomonas*[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(11): e1006019.
- [15] JITTAWUTTIPOKA T, SALLABHAN R, VATTANAVIBOON P, FUANGTHONG M, MONGKOLSUK S. Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. *Archives of Microbiology*, 2010, 192(5): 331-339.
- [16] 王志鹏, 于海英, 马旅雁. 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3253-3267.
- WANG ZP, YU HY, MA LY. Construction and phenotypic study of *Pseudomonas aeruginosa* inducibly expressing a ferric uptake regulator[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3253-3267 (in Chinese).
- [17] PANDEY SS, CHATTERJEE S. Insights into the cell-to-cell signaling and iron homeostasis in *Xanthomonas* virulence and lifestyle[J]. *Phytopathology*, 2022, 112(2): 209-218.
- [18] LI YR, ZOU HS, CHE YZ, CUI YP, GUO W, ZOU LF, CHATTERJEE S, BIDDLE EM, YANG CH, CHEN GY. A novel regulatory role of HrpD6 in regulating *hrp-hrc-hpa* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(9): 1086-1101.
- [19] ROY S, MITTAL P, TAYI L, BONDADA S, RAY MK, PATEL HK, SONTI RV. *Xanthomonas oryzae* pv.

- oryzae* exoribonuclease R is required for complete virulence in rice, optimal motility, and growth under stress[J]. *Phytopathology*, 2022, 112(3): 501-510.
- [20] ROSCH JW, GAO GL, RIDOUT G, WANG YD, TUOMANEN EI. Role of the manganese efflux system *mntE* for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(1): 12-25.
- [21] PALMER LD, SKAAR EP. Transition metals and virulence in bacteria[J]. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 67-91.
- [22] ZUGHAIER SM, CORNELIS P. Editorial: role of iron in bacterial pathogenesis[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 344.
- [23] LIU Y, KONG DY, WU HL, LING HQ. Iron in plant-pathogen interactions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(6): 2114-2124.
- [24] GANZ T, NEMETH E. Iron homeostasis in host defence and inflammation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(8): 500-510.
- [25] HIDER RC, KONG XL. Chemistry and biology of siderophores[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(5): 637-657.
- [26] MIETHKE M, MARAHIEL MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2007, 71(3): 413-451.
- [27] ANDREWS SC, ROBINSON AK, RODRÍGUEZ-QUIÑONES F. Bacterial iron homeostasis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2-3): 215-237.
- [28] LATIFI A, JEANJEAN R, LEMEILLE S, HAVAUX M, ZHANG CC. Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(18): 6596-6598.
- [29] PASQUA M, VISAGGIO D, LO SCIUTO A, GENAH S, BANIN E, VISCA P, IMPERI F. Ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(22): e00472-17.
- [30] BERLUTTI F, MOREA C, BATTISTONI A, SARLI S, CIPRIANI P, SUPERTI F, AMMENDOLIA MG, VALENTI P. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2005, 18(4): 661-670.
- [31] PATRIQUIN GM, BANIN E, GILMOUR C, TUCHMAN R, GREENBERG EP, POOLE K. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 662-671.
- [32] MA LZ, WANG D, LIU YW, ZHANG ZY, WOZNIAC DJ. Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2022, 76: 413-433.
- [33] SINGH PK, PARSEK MR, GREENBERG EP, WELSH MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development[J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 552-555.
- [34] LIMOLI DH, JONES CJ, WOZNIAC DJ. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(3): 10.1128/microbiolspec.MB-10.1128/microbiolspe0011-2014.
- [35] MITTLER R, ZANDALINAS SI, FICHMAN Y, van BREUSEGEM F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 663-679.

(本文责编 郝丽芳)