

• 农业生物技术 •

Zur 参与大豆斑疹病菌在寄主上的致病性和在非寄主上的过敏性反应

林思怡^{1#}, 郑银邦^{1#}, 练梦洁¹, 金罗佳¹, 耿慧雅¹, 徐江玲¹, 纪志远², 郭威^{1*}

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

林思怡, 郑银邦, 练梦洁, 金罗佳, 耿慧雅, 徐江玲, 纪志远, 郭威. Zur 参与大豆斑疹病菌在寄主上的致病性和在非寄主上的过敏性反应[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3603-3618.

LIN Siyi, ZHENG Yinbang, LIAN Mengjie, JIN Luojia, GENG Huiya, XU Jiangling, JI Zhiyuan, GUO Wei. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Zur is involved in pathogenicity in host and hypersensitive responses in nonhosts[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3603-3618.

摘要: 锌吸收调控蛋白(zinc uptake regulator, Zur)在植物病原黄单胞菌中的序列高度保守, 但在不同菌株或小种中的功能却差异显著。为阐明 Zur 在大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, Xag)中的功能, 本研究利用同源重组策略获得了 zur 基因的缺失突变株(Δzur)。该突变株在寄主大豆上的致病性和在非寄主(烟草、番茄、辣椒和茄子)上激发超敏反应(hypersensitive responses, HR)能力相较于野生型均显著减弱。此外, 与野生型菌株相比, 突变株 Δzur 的胞内锌稳态失衡, 细胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)产量和胞外水解酶(纤维素酶、内切葡聚糖酶、淀粉酶和蛋白酶)表达均大幅降低, 而且其对 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的敏感性显著增强。功能互补可将突变株 Δzur 的上述缺陷性表型恢复至野生型水平。荧光定量 PCR 结果表明, zur 基因受 Zn^{2+} 诱导表达; 且 zur 基因突变大幅降低 hrp 基因簇代表性基因(*hrpB1*、*hrpD6*、*hrpE*、*hrcV* 和 *hrcC*)、胞外水解酶编码基因(*engXCA*、*egl2*、*pro1*、*pro2*、*pro8*、*pro11* 和 *alpha1*)和 EPS 合成基因(*gumB*、*gumD*、*gumK*、*gumM*、*gumG* 和 *gumH*)的表达水平。这些结果表明, Zur 可能通过调控毒性因子合成和 hrp 基因表达, 从而参与 Xag 在寄主大豆上的致病性和在非寄主植物上激发 HR 能力。本研究为进一步解析 Zur 在黄单胞菌-植物互作中的作用机制奠定了基础。

关键词: 大豆斑疹病菌; 锌吸收调控蛋白; 致病性; 过敏性反应

资助项目: 国家大学生创新创业训练计划(202210345031); 浙江省大学生科技创新活动计划(2023R404037)
This work was supported by the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202210345031) and the Scientific and Technological Innovation Activities for Zhejiang Undergraduate (2023R404037).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: weiguo817@zjnu.cn

Received: 2023-11-29; Accepted: 2024-04-12; Published online: 2024-04-17

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* Zur is involved in pathogenicity in host and hypersensitive responses in nonhosts

LIN Siyi^{1#}, ZHENG Yinbang^{1#}, LIAN Mengjie¹, JIN LuoJia¹, GENG Huiya¹, XU Jiangling¹, JI Zhiyuan², GUO Wei^{1*}

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

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

Abstract: The zinc uptake regulator (*Zur*) has highly conserved sequences in the plant pathogen *Xanthomonas*, while its functions are diverse in different strains or races. To elucidate the functions of *Zur* in *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), we constructed a *zur*-deleted mutant (Δzur) by homologous recombination. Compared with the wild type, Δzur demonstrated reduced pathogenicity in the host soybean and reduced ability to trigger hypersensitive responses (HR) in nonhosts such as tobacco, tomato, chili pepper, and eggplant. Additionally, the deletion of *zur* significantly enhanced *Xag*'s sensitivity to Zn^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} , induced an imbalance in intracellular zinc homeostasis, decreased extracellular polysaccharide (EPS) production, and down-regulated the expression of extracellular hydrolases (cellulase, endo-glucanase, amylase, and protease). Functional complementation restored the defective properties of Δzur to the wild-type levels. The qRT-PCR results showed that *zur* expression was remarkably induced by Zn^{2+} . Moreover, the deletion of *zur* evidently reduced the expression levels of *hrp* representative genes (*hrpB1*, *hrpD6*, *hrpE*, *hrcV*, and *hrcC*), extracellular hydrolase encoding genes (*engXCA*, *egl2*, *pro1*, *pro2*, *pro8*, *pro11*, and *alpha1*), and EPS synthesis genes (*gumB*, *gumD*, *gumK*, *gumM*, *gumG*, and *gumH*) relative to the wild type. In summary, the results suggested that *Zur* may be involved in pathogenicity in the host soybean and in triggering HR in nonhosts of *Xag* by regulating the synthesis of virulence factors and the expression of *hrp* genes. This laid a foundation for further analysis of the mechanism of *Zur* in *Xanthomonas*-plant interaction.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*); zinc uptake regulator (*Zur*); pathogenicity; hypersensitive response (HR)

黄单胞菌属(*Xanthomonas* spp.)是一类重要的植物病原细菌,其种类繁多且寄主范围甚广,可侵染近400种植物,包括大豆、水稻、木薯、柑橘、甘蓝、辣椒等^[1-2]。其主要通过伤口、水孔或气孔侵入植物组织,引起叶斑、叶枯、萎蔫、溃疡或果斑等多种类型的病害症状^[3-4]。大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xag*)是重要的植物病原黄单胞菌之一,由其引

起的大豆斑疹病(bacterial pustule, BP)是大豆的检疫性病害^[5]。该病原菌从气孔或伤口侵入大豆叶片,导致叶片褐色枯斑累累、早枯脱落,严重威胁大豆的安全生产^[6]。

锌是细菌不可或缺的微量元素,它不仅是多种蛋白质和酶的结构成分,而且还参与多种生理功能^[7]。例如, Zn^{2+} 可促进铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的生物膜形成,并影响

其游动性^[8]; Zn²⁺影响天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的抗生素产生和芽孢形成^[9]。但 Zn²⁺摄取过量会破坏菌体细胞膜的功能,干扰细胞代谢过程,甚至导致细胞死亡^[10-12]。为此,细菌演化出严格且精细的锌稳态调控网络,以调节 Zn²⁺的吸收、利用和储藏^[13]。在细菌胞内,维持锌稳态需要 Zn²⁺吸收系统、外排系统和保护系统的协同作用^[7]。

锌吸收调控蛋白(zinc uptake regulator, Zur)是细菌胞内重要的锌稳态调节子,可调控 Zn²⁺的吸收及相关基因的表达,从而避免菌体因 Zn²⁺摄取过量而导致中毒^[14]。Zur 也可作为一种蛋白质直接或间接参与细菌的一些生理功能,如致病性、离子耐受性、毒性因子合成等^[13,15]。在水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) PXO99^A 菌株中,Zur 失活会降低菌株的胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)产量,削弱菌株在寄主水稻上的致病性(pathogenicity),但不影响菌株在非寄主烟草上激发过敏反应(hypersensitive response, HR)能力^[16]。与 Xoo 相比,野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc)的 Zur 却表现出不同的功能,Zur 参与 8004 菌株的 EPS 合成和在非寄主辣椒上激发 HR 能力,但 Zur 失活并不影响 XC1 菌株的 EPS 合成和胞外水解酶基因表达等^[17-18]。这些结果表明,Zur 在植物病原黄单胞菌中的生物学功能具有差异性或多样性,表现出菌株或小种特异性。

由黄单胞菌超敏反应和致病性(hypersensitive response and pathogenicity, hrp)基因簇编码的III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)可在非寄主植物上激发 HR 和在感病寄主植物上引起致病性^[19]。hrp 基因簇由 6 个转录单元(*hrpA-hrpF*)组成,包含 20 多个不同的 *hrp-hrc-hpa* 基因^[18],该基因簇表达除直接受 HrpG/HrpX

级联调控外^[20],也可受部分转录调控因子直接或间接调控,如 Zur^[18]、RsmA^[21]等。然而 Zur 调控不同植物病原黄单胞菌 *hrp* 基因簇的表达方式有一定差异,表现出菌株特异性。在 Xcc 中,8004 菌株的 Zur 通过 *hrpX* 激活 *hrpA-hrpF* 转录单元的表达^[18];而 XC1 菌株的 Zur 并不调控 *hrp* 基因簇的表达^[17]。在 Xoo PXO99^A 菌株和水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc) RS105 菌株中,Zur 和 HrpG 以平行独立方式不依赖 *hrpX* 即可调控 *hrpA* 转录单元的表达;但需依赖 *hrpX* 调控 *hrpB-hrpF* 转录单元的表达^[19,22]。这些结果表明,不同植物病原黄单胞菌的 Zur 对 *hrp* 基因簇调控具有菌株特异性。Zur 是否调控 *hrp* 基因簇表达进而影响 Xag 与(非)寄主植物互作尚不清楚。

为探究 Zur 在 Xag 与(非)寄主植物互作中的功能,本研究构建了 ZJ15 菌株的 *zur* 基因缺失突变株(Δzur),通过分析 Δzur 的植物表型、离子敏感性、胞内锌稳态、毒性因子合成以及致病相关基因表达等,明确了 Xag 中 Zur 的功能。在先前 Zur (Xoo、Xoc 和 Xcc)功能研究的基础上,本研究进一步挖掘并丰富了植物病原黄单胞菌 Zur 的功能谱及调控网络,为深度解析 Zur 在黄单胞菌与植物互作中的作用机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

Xag 及其衍生菌株置于 28 °C 培养,大肠杆菌(*Escherichia coli*)置于 37 °C 培养。

NB 培养基(g/L):多聚蛋白胨 5.0,酵母提取物 1.0,蔗糖 10.0,牛肉浸膏 3.0;NY 培养基(g/L):多聚蛋白胨 5.0,酵母提取物 1.0;LB 培

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> DH5 α	Φ 90, <i>lacZ</i> Δ m15, <i>recA1</i>	This lab
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ZJ15	Wild-type, the pathogen of soybean bacterial spot disease, <i>car</i> ^r	This lab
Δ <i>zur</i>	<i>zur</i> deletion mutant of strain ZJ15, <i>car</i> ^r	This study
C Δ <i>zur</i>	Δ <i>zur</i> harboring pHM1- <i>zur</i> , <i>car</i> ^r	This study
Plasmids		
pKMS1	Suicide vector derivative from pK18mobGII, <i>sacB</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ , <i>kan</i> ^r	This lab
pHM1	Wide host plasmid with pUC19 multiple cloning site, <i>mob</i> ⁺ , <i>spe</i> ^r	This lab
pK Δ <i>zur</i>	The upstream and downstream fragments of <i>zur</i> were fused into pKMS1 vector, <i>kan</i> ^r	This study
pC Δ <i>zur</i>	The <i>zur</i> promoter and its ORF fragment were constructed into pHM1 vector, <i>spe</i> ^r	This study

car^r, *kan*^r and *spe*^r indicate resistance to carbenicillin, kanamycin and spectinomycin, respectively.

培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0^[22]。

抗生素: 羧苄青霉素(carbenicillin, *car*) 60 μ g/mL; 卡那霉素(kanamycin, *kan*) 25 μ g/mL; 壮观霉素(spectinomycin, *spe*) 100 μ g/mL^[5]。

1.1.2 植物材料

本研究所用大豆(*Glycine max* L.)品种为中黄11, 烟草品种为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*, Nb)和三生烟(*Nicotiana tabacum*, Nt), 番茄(*Solanum lycopersicum* L.)品种为金玲珑, 茄子(*Solanum melongena* L.)品种为杭茄1号, 辣椒(*Capsicum annuum* L.)品种为二荆条。所有植物材料均种植于光照培养箱或温室中。

1.1.3 试剂和引物

gDNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒等均购于 Axygen 公司(杭州)。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex *Taq* 酶、RNAiso Plus 试剂、AMV 反转录试剂盒和 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 等购自 TaKaRa 公司(大连)。

引物(表 2)由北京擎科生物科技股份有限公司(杭州)合成。

1.2 方法

1.2.1 *zur* 基因序列相似性分析

通过 PCR 手段克隆 ZJ15 菌株的 *zur* 基因片段并测序, 然后将其提交 NCBI 进行 BLAST 比对, 获得不同植物病原黄单胞菌[如 *Xag*、*Xcc*、*Xoc*、*Xoo*、柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xac*)和辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*)等]间的 *zur* 基因 DNA 序列相似性。同时从 NCBI 网站获取上述不同植物病原黄单胞菌的 *zur* 基因序列, 再利用 BioEdit 软件逐一比对确认其与 ZJ15 菌株 *zur* 基因的 DNA 序列相似性。

1.2.2 *zur* 基因缺失突变体及其功能互补菌株的构建

基于同源重组原理构建 *zur* 基因的缺失突变株^[23]。以 gDNA 为模板, 扩增 *zur* 基因的上、下游序列片段, 经融合后构建至自杀载体 pKMS1^[19], 命名为 pK Δ *zur*。利用电激法将重组载体 pK Δ *zur* 导入至 ZJ15 感受态细胞中, 经 2 次同源重组交换获得 *zur* 基因缺失突变子, 经巢式 PCR 验证后, 命名为 Δ *zur*。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>zur</i> -up-F1	AATCTAGACGACCAGGAGCTGTTCACCCA	602
<i>zur</i> -up-R1	ATAAGCTTACAGGCTCCGGCGTCAGGCCG	
<i>zur</i> -down-F2	ATAAGCTTTCGACTGCCAGGTCGTGCGTA	314
<i>zur</i> -down-R2	TACTGCAGACGTCGGTTGCGACTTCACTG	
<i>zur</i> -F3	CGAGCTCGACGACATGGTGAT	1 990
<i>zur</i> -R3	CCAGGAGGAAGGCATACAACG	
<i>zur</i> -complementation-F	TAAAGCTTCATCGCCCCGAGTTGGAATA	971
<i>zur</i> -complementation-R	ATGAATTCTTACTCCGCCACTGCGCATT	
<i>ihfA</i> -F	GCATTGACGAAAGCGGAGATG	257
<i>ihfA</i> -R	AGTTTTTGGCCAGGGCGGAAC	
<i>hrpB1</i> -F	GTCGGACTCACCCATGACAA	213
<i>hrpB1</i> -R	GAACAGGCAGCAGGCCGTA	
<i>hrpD6</i> -F	ACCGATACGGTCACCCAAGA	192
<i>hrpD6</i> -R	TGCTGCAGTAATCCCGTCAT	
<i>hrpE</i> -F	CGAGGCACAGAAGTCCATGA	124
<i>hrpE</i> -R	TTACTGGCCAACGAGCTGC	
<i>hrcV</i> -F	GGCGCCATGAAATTCGTCAA	193
<i>hrcV</i> -R	CAGCCACCGATATCAGCAGT	
<i>hrcC</i> -F	CGAAGTGCAGGTGTTTCAGC	210
<i>hrcC</i> -R	TTGCCGAATGTGTTGGAGGA	
<i>zur</i> -F	AGGCCTACGAATTGCTGGAC	226
<i>zur</i> -R	TCGCGATCTTCCAGTTCCAC	
<i>engXCA</i> -F	GCCCAGCAGCATCGACTACAGC	200
<i>engXCA</i> -R	AGCGCAGATCATCCAGCCATTG	
<i>egl2</i> -F	GCAGGTGCGCATCCATCGGTC	157
<i>egl2</i> -R	ATACTGCTCGTAGGCCGCCAG	
<i>pro1</i> -F	GACCCCAGCGTGGACTATGTG	231
<i>pro1</i> -R	GATGAAGTCGTAACCCGGCAG	
<i>pro2</i> -F	GATGCTGTACCCCACGCTGAC	195
<i>pro2</i> -R	AAGTCGTAGCCGGCAGGATG	
<i>pro8</i> -F	ACCCCAATGGCGGCATCAATG	133
<i>pro8</i> -R	TCGTAGCCCCTGCAGGATGTTG	
<i>pro11</i> -F	CATTGCCGAACGATCCGCTGC	205
<i>pro11</i> -R	GAGAAGAACGGATCGGTGATG	
<i>alpha1</i> -F	TGGGCAACGACTGGGTGGTAC	226
<i>alpha1</i> -R	TGCAGGTACGGCGCCAGGAAC	
<i>gumB</i> -F	TTGGAAAAGATGGTGGCCGAC	226
<i>gumB</i> -R	TGCGAAACACGATGACATTGC	
<i>gumD</i> -F	CGCGACAATTACTTCGTGGTG	228
<i>gumD</i> -R	CTGAATCGTCGTGCCATGGTC	
<i>gumK</i> -F	CGGTTCTTCTCGCTGCGTTAC	240
<i>gumK</i> -R	ATCTGCCTCGCGCATCCAGTC	
<i>gumM</i> -F	GCGCTGGATCCTGGACCACAG	145
<i>gumM</i> -R	GAGCAGCCGATACATCCATTC	
<i>gumG</i> -F	TCGTGTTGTGCGGGCTGGGTTG	230
<i>gumG</i> -R	ATACAGGCGTGACCCATTGGC	
<i>gumH</i> -F	CAGGACACGCATCAAGGGCTG	231
<i>gumH</i> -R	CTTCATGCGCGATGCGTAGGC	

以 gDNA 为模板, 扩增 *zur* 基因[启动子和完整编码序列(coding sequence, CDS)区], 并将其构建至功能互补载体 pHM1^[19], 命名为 pCΔ*zur*。利用电激法将重组载体 pCΔ*zur* 导入至 Δ*zur* 感受态细胞中获得功能互补子, 经抗生素筛选及 PCR 验证后, 命名为 CΔ*zur*。

1.2.3 植物表型

为测定突变株 Δ*zur* 在寄主大豆上的致病性, 将各菌株培养物($OD_{600}=0.3$)喷雾接种至大豆叶片上, 14 d 后观察叶片发病症状^[6]。为测定突变株 Δ*zur* 在寄主大豆叶片组织中的生长能力, 利用无针注射器将菌悬液($OD_{600}=0.1$)注入大豆叶片组织中, 每隔 24 h 剪取接种区域研磨、稀释、涂板, 连续测定 7 d^[6]。为测定突变株 Δ*zur* 在非寄主植物上激发 HR 能力, 将各菌株培养物($OD_{600}=0.5$)注入非寄主(烟草、茄子、番茄和辣椒)叶片组织中, 48 h 后观察叶片症状, 实验重复 3 次^[19]。

1.2.4 离子敏感性测定

将待测菌株培养至 $OD_{600}=1.0$, 取 2 mL 菌悬液接种至 NA 平板上, 使菌悬液完全覆盖平板表面, 静置 5 min 后去除多余菌液。将含 2 μL ZnSO₄ (1.25 mol/L)、FeCl₃ (1.25 mol/L)或 CuSO₄ (1.25 mol/L)溶液的滤纸片放置于平板中央, 28 °C 静置培养 48 h 后, 观察滤纸片周围抑菌圈的形成, 实验重复 3 次^[24]。

1.2.5 胞内锌稳态分析

将待测菌株培养至 $OD_{600}=1.0$, 离心收集菌体, 用灭菌去离子水将菌液浓度调至 $OD_{600}=0.5$, 按 1% 比例将菌悬液分别接种至含 0、0.05、0.1、0.15、0.2 或 0.25 mmol/L Zn²⁺的 20 mL NY 培养基中, 28 °C 振荡培养 24 h, 每 3 h 测定 1 次 OD_{600} , 实验重复 3 次^[25]。

1.2.6 胞外水解酶表达检测

将待测菌株培养至 $OD_{600}=2.8$, 离心收集上

清液并过滤除菌, 取 30 μL 分别加入至含 0.2% 可溶性淀粉、1% 脱脂牛奶、0.5% 羧甲基纤维素或 0.2% 刺槐豆胶的 NA 平板小孔内, 28 °C 静置培养 24–48 h, 对培养平板分别进行相应的染色处理后, 观察测试孔周围水解圈的形成, 实验重复 3 次^[5]。

1.2.7 EPS 测定

为定性分析突变株 Δ*zur* 的 EPS 合成, 取 2 μL 待测菌株培养物($OD_{600}=1.0$)接种于含 2% 葡萄糖(或蔗糖)的 NY 固体培养基上, 静置培养 7 d 后观察菌落形态。为定量测定突变株 Δ*zur* 的 EPS 产量, 按 1% 比例将各菌株培养物($OD_{600}=1.0$)接种于含 2% 葡萄糖(或蔗糖)的 NY 液体培养基中, 振荡培养 5 d 后离心去除菌残体, 然后利用无水乙醇沉淀上清液中的 EPS, 55 °C 干燥后称重, 实验重复 3 次^[5]。

1.2.8 荧光定量 PCR

为检测胞外水解酶编码基因和 EPS 合成基因的表达水平, 将待测菌株于 NB 培养基中培养至 $OD_{600}=2.0$, 离心收集菌体用于 RNA 提取; 为检测 *hrp* 基因簇代表性基因的表达水平, 利用无针注射器将待测菌株菌悬液($OD_{600}=0.1$)注入大豆叶片组织中, 24 h 后剪取注射区域叶片, 于液氮中研磨成粉末用于 RNA 提取; 为检测 *zur* 基因在 Zn²⁺胁迫条件下的表达水平, 将 *Xag* 野生型菌株于 NB 培养基中培养至 $OD_{600}=1.5$, 向其内分别添加外源 Zn²⁺至不同浓度(0、0.05、0.10、0.15、0.20 或 0.25 mmol/L)并继续共培养 4 h, 离心收集菌体用于 RNA 提取。按照 RNAiso Plus (TaKaRa 公司)操作说明提取菌株的总 RNA, 并用无 RNase 的 DNase 去除 gDNA 痕迹, 经分光光度计和凝胶电泳检测质量后, 再按照 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa 公司)操作说明合成 cDNA^[19]。以 *ihfA* 基因为内参^[6], 使用 SYBR[®] Premix DimerEraserTM (TaKaRa 公司)试剂

盒并应用 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 对目标基因进行扩增。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 不同植物病原黄单胞菌的 *zur* 基因序列高度保守

由生物信息学分析可知, *zur* 基因在 *Xag* 的 3 个菌株(12-2、ZJ15 和 8ra)中具有 100% 的 DNA 序列相似性。此外, *Xag* ZJ15 菌株的 *zur* 基因与 *Xac* (306 菌株)、*Xoo* (PXO99^A、MAFF311018 和 KACC10331 菌株)、*Xoc* (BLS256 和 RS105 菌株)、*Xcc* (8004、ATCC33913 和 XC1 菌株)、*Xcv* (85-10 菌株)等中的 *zur* 基因均具有 90% 以上的 DNA 序列相似性。这些结果表明, 不同植物病原黄单胞菌的 *zur* 基因序列具有高度相似性。

2.2 大豆斑疹病菌 *zur* 基因缺失突变株的构建及验证

为明确 *Xag* 中 *zur* 基因的功能, 利用同源重组策略构建 *zur* 基因无标记缺失的突变株(图 1A)。为筛选经 2 次同源重组获得的正确双交换子, 借助 2 轮巢式 PCR 对其进行验证。以上游同源臂引物(*zur*-up-F1)和下游同源臂引物(*zur*-down-R2)为组合或以上游同源臂外延引物(*zur*-F3)和下游同源臂外延引物(*zur*-R3)为组合, 扩增获得的 DNA 片段相较于野生型均减小 507 bp (图 1B)。这说明本研究成功获得了 *zur* 基因的缺失突变株(命名为 Δzur)。

2.3 *zur* 基因缺失削弱大豆斑疹病菌在大豆上的致病性

为探究 *zur* 基因在寄主大豆上的致病性作用, 采用喷雾法将突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株分别接种于大豆叶片表面。接种 14 d 后, 观察到各菌株均可在大豆叶片上引起

褐色的疱疹状病斑; 但突变株 Δzur 所产生的病斑数量相较于 $C\Delta zur$ 和野生型菌株均明显减少(图 2A)。为准确评估 *zur* 基因在 *Xag* 致病性中所发挥的作用, 采用无针注射法将突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株分别注入大豆叶片组织中。在观察期内的各个测试点, 突变株 Δzur 在叶片中的繁殖能力相较于野生型均显著减弱; 功能互补可将突变株 Δzur 的繁殖能力恢复至野生型水平(图 2B)。这些结果表明, *zur* 基因是 *Xag* 对大豆具有致病性所必需的。

2.4 *zur* 基因缺失削弱大豆斑疹病菌在非寄主植物上激发 HR 能力

为明确 *zur* 基因是否参与 *Xag* 在非寄主植物上激发 HR 能力, 采用无针注射法将突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株分别注入非寄主(辣椒、烟草、番茄和茄子)叶片组织中。接种 48 h 后, 观察到突变株 Δzur 在上述非寄主植物上均可激发 HR, 但其激发 HR 能力相较于野生型菌株均显著削弱; 功能互补可将突变株 Δzur 激发 HR 能力恢复至野生型水平(图 3A–3F)。这些结果说明, *zur* 基因是 *Xag* 在非寄主植物上激发 HR 所需的。

为初步探究 *zur* 基因参与 *Xag* 在非寄主植物上激发 HR 的机理, 利用荧光定量 PCR 检测 *hrp* 基因簇代表性基因(*hrpB1*、*hrpD6*、*hrpE*、*hrcV* 和 *hrcC*)的表达水平。相较于在野生型菌株中, 上述检测基因在突变株 Δzur 中的表达水平均大幅下调, 其中 *hrpD6* 和 *hrpE* 基因的表达下调最为显著, 降幅高达 80% 以上(图 3G)。这表明 *zur* 基因突变显著抑制 *hrp* 基因簇基因的表达, 从而削弱突变株 Δzur 在非寄主植物上激发 HR 能力。

2.5 *zur* 基因缺失显著增强大豆斑疹病菌对 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的敏感性

为探究 *zur* 基因是否参与 *Xag* 响应金属离

子的胁迫, 采用平板抑菌圈法分别测定 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株的胁迫能力。由图 4 可知, Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 均能对突变株 Δzur 、 $C\Delta zur$ 及野生型菌株产生较明显的抑制作用; 但上述 3 种离子对突变株 Δzur 的抑制作用相较于野生型菌株显著增强(图 4)。功能互补可将突变株 Δzur 对 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的耐受性恢复至野生型水平(图 4)。

这些结果揭示, *zur* 基因缺失增强 *Xag* 对 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的响应敏感性, 提示 *zur* 基因可能在维持 *Xag* 胞内金属离子稳态方面起重要作用。

2.6 *zur* 基因参与维持大豆斑疹病菌胞内的锌稳态

为探究 *zur* 基因是否参与维持 *Xag* 胞内的锌稳态, 分别测定突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株在含不同 Zn^{2+} 浓度培养液中的生

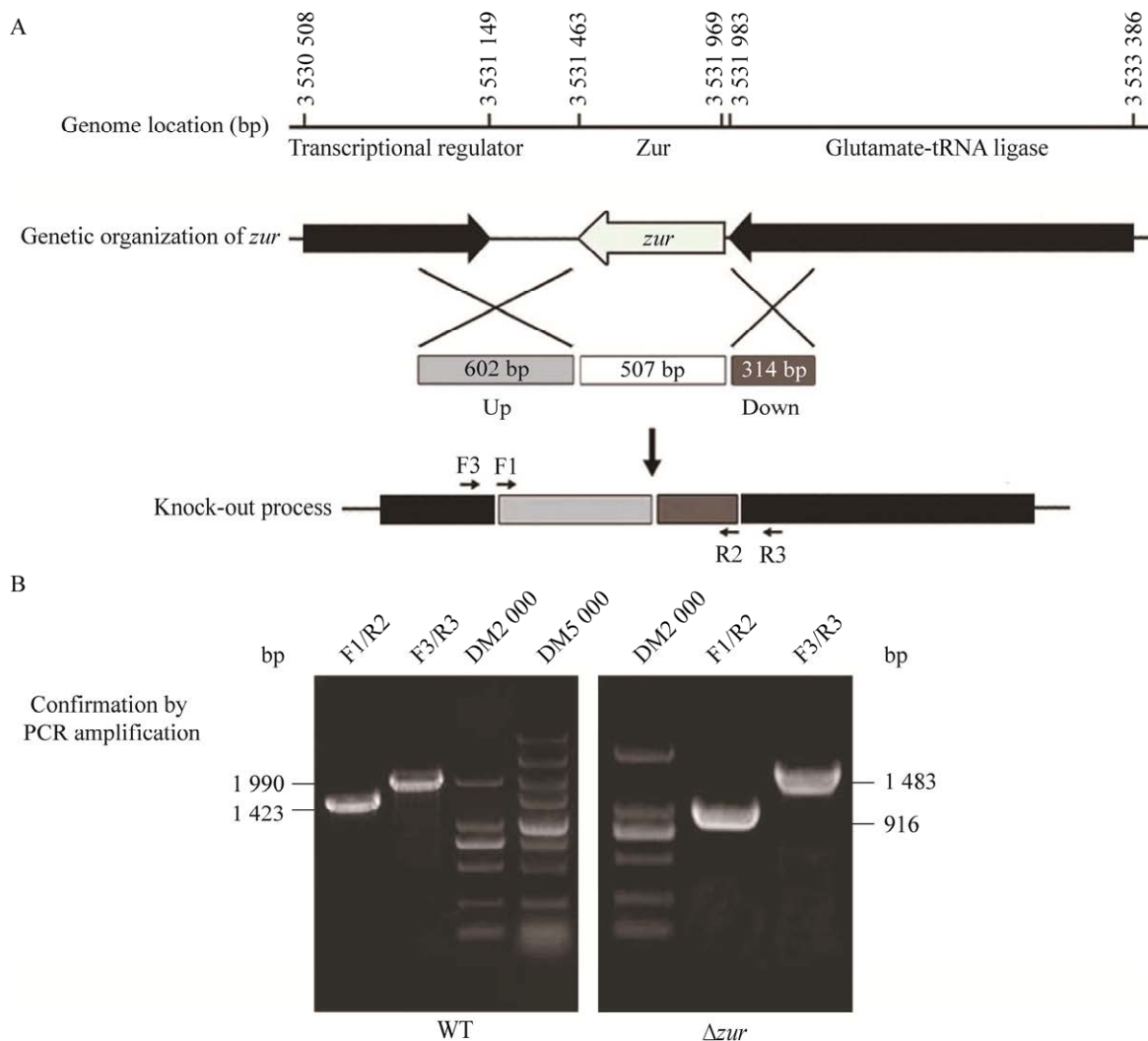


图 1 大豆斑疹病菌 *zur* 基因缺失突变株的构建 A: *zur* 基因缺失突变示意图. B: *zur* 基因缺失突变株的验证. WT: ZJ15 菌株; Δzur : *zur* 基因缺失突变体

Figure 1 Construction of the *zur*-deleted mutant from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. A: Construction diagram of *zur*-deleted mutant. B: Verification of *zur* deletion mutants. WT: ZJ15 strain; Δzur : *zur* deletion mutant.

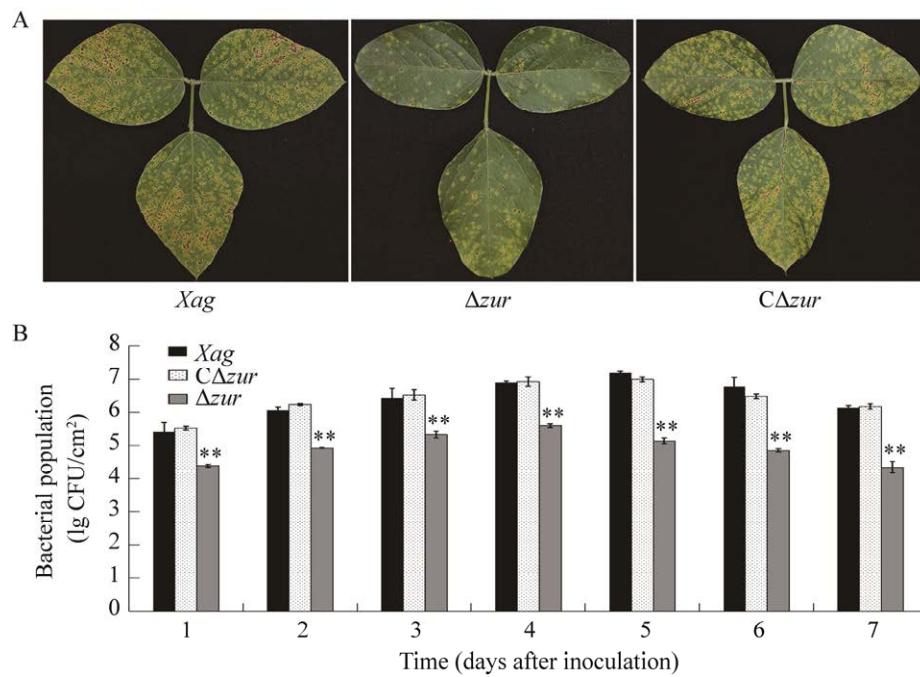


图 2 突变株 Δzur 在寄主大豆上的致病性 A: 在叶片表面形成疱疹状斑的能力. B: 在叶片组织中的繁殖能力. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t 检验)

Figure 2 Pathogenicity of Δzur in host soybean. A: The ability to form bacterial pustule on the surface of soybean leaves. B: Reproductive capacity in soybean leaf tissue. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t -test).

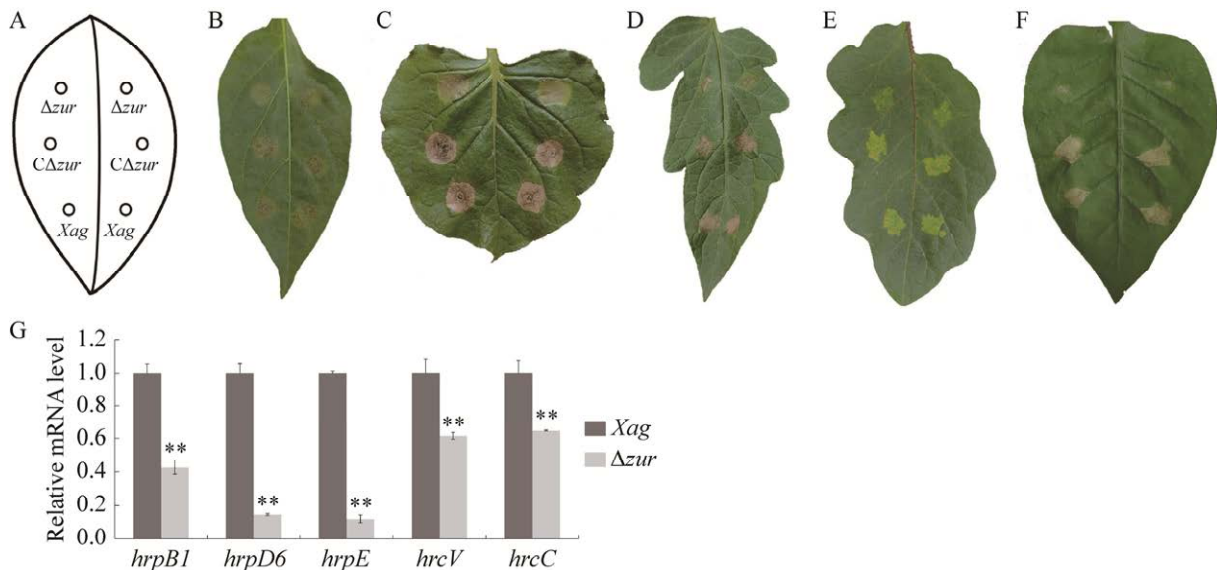


图 3 突变株 Δzur 在非寄主植物上激发 HR 能力 A: 各菌株接种示意图. B–F: 依次为辣椒、本氏烟、番茄、茄子、三生烟. G: *hrp* 基因簇代表性基因的表达水平. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t 检验)

Figure 3 The ability of Δzur to trigger HR on nonhost plants. A: Inoculation diagram for each strain. B–F: Followed by chili peppers, tobacco (Nb), tomato, eggplant, and tobacco (Nt). G: Expression level of representative genes from *hrp* gene cluster. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t -test).

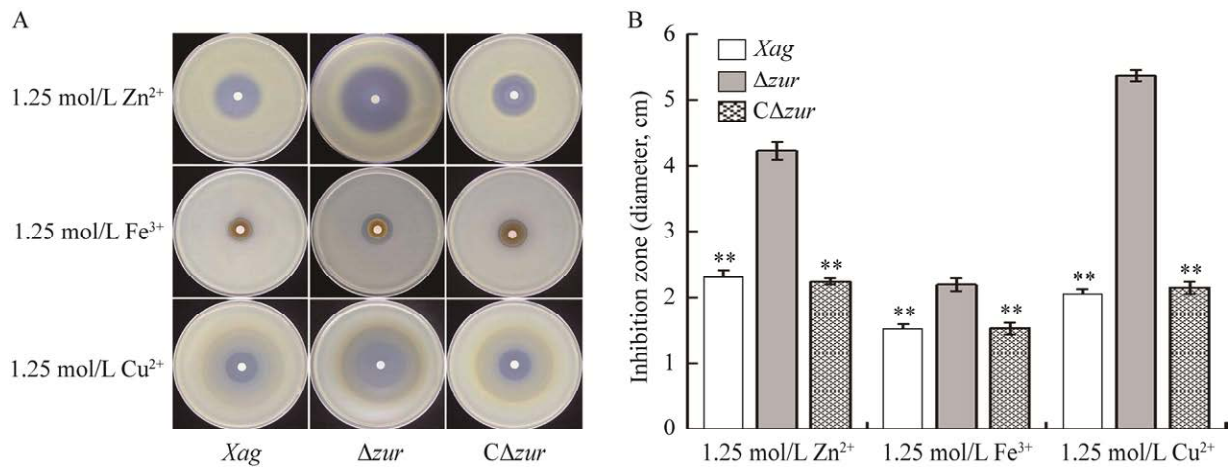


图4 突变株 Δzur 对 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的敏感性分析 A:各菌株在 Zn^{2+} (1.25 mol/L)、 Fe^{3+} (1.25 mol/L)或 Cu^{2+} (1.25 mol/L)胁迫下形成的平板抑菌圈。B:测试平板上形成的抑菌圈直径。**: $P < 0.01$; $n = 3$ (t 检验)

Figure 4 Sensitivity analysis of Δzur against Zn^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} . A: The inhibition zone formed by each strain under Zn^{2+} (1.25 mol/L), Fe^{3+} (1.25 mol/L), or Cu^{2+} (1.25 mol/L) stress. B: The inhibition zone diameter formed on the test plates. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t -test).

长能力。结果显示,相较于 $C\Delta zur$ 和野生型菌株,突变株 Δzur 对 Zn^{2+} 的响应敏感性伴随外源 Zn^{2+} 浓度的增加而逐渐增强;当 Zn^{2+} 浓度达到0.25 mmol/L时, $C\Delta zur$ 和野生型菌株的生长基本不受影响,但突变株 Δzur 完全被抑制而无法生长(图5)。这说明 zur 基因在维持 Xag 胞内锌稳态中发挥重要作用。

2.7 Zn^{2+} 显著诱导大豆斑疹病菌 zur 基因的表达

为明确 Zn^{2+} 是否诱导或抑制 zur 基因的表达,利用荧光定量PCR分析 zur 基因在响应不同外源 Zn^{2+} 浓度条件下的转录水平。在不影响野生型菌株正常生长的外源 Zn^{2+} 浓度(≤ 0.25 mmol/L)条件下,各测试的外源 Zn^{2+} 浓度均能显著诱导 zur 基因的表达;并且随着适量外源 Zn^{2+} 浓度(≤ 0.2 mmol/L)的增加, zur 基因受 Zn^{2+} 诱导表达的趋势逐渐增强;当外源 Zn^{2+} 浓度达到0.2 mmol/L时, zur 基因的表达水平达到顶峰,是非诱导条件下表达量的35倍(图6)。

这些结果表明, Zn^{2+} 能显著诱导 zur 基因的表达。

2.8 zur 基因缺失大幅降低大豆斑疹病菌的胞外水解酶表达

为探究 zur 基因缺失是否影响 Xag 的胞外水解酶表达,采用平板法对 Xag 的4种重要胞外水解酶活性进行测定。相较于野生型菌株,突变株 Δzur 的胞外淀粉酶、胞外蛋白酶、胞外纤维素酶和内切葡聚糖酶表达均显著降低;功能互补可将突变株 Δzur 的上述4种胞外水解酶缺陷性表达恢复至野生型水平(图7A-7D)。这表明 zur 基因是 Xag 胞外水解酶表达所需的。

为解析 zur 基因缺失削弱 Xag 胞外水解酶表达的原因,采用荧光定量PCR分析胞外水解酶编码基因的表达水平。结果表明,相较于在野生型菌株中,胞外淀粉酶基因($\alpha 1$)、胞外蛋白酶基因($pro1$ 、 $pro2$ 、 $pro8$ 和 $pro11$)、胞外纤维素酶与内切葡聚糖酶基因($engXCA$ 和 $egl2$)在突变株 Δzur 中的表达水平均显著下调(图7E)。这说明 zur 基因突变显著降低 Xag 胞外水解酶

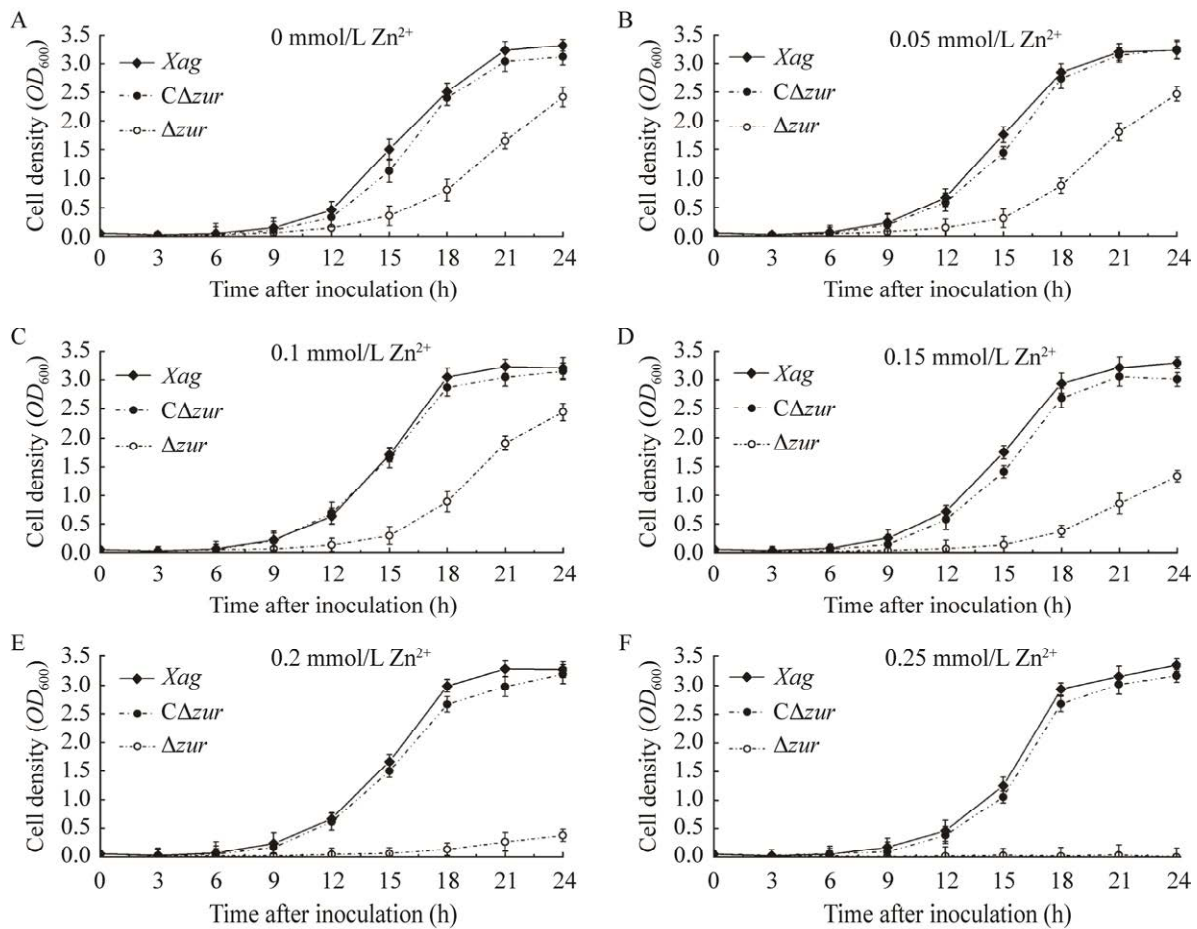


图 5 突变株 Δzur 在含不同外源 Zn^{2+} 浓度培养液中的生长曲线
Figure 5 Growth curves of Δzur under different exogenous Zn^{2+} concentrations.

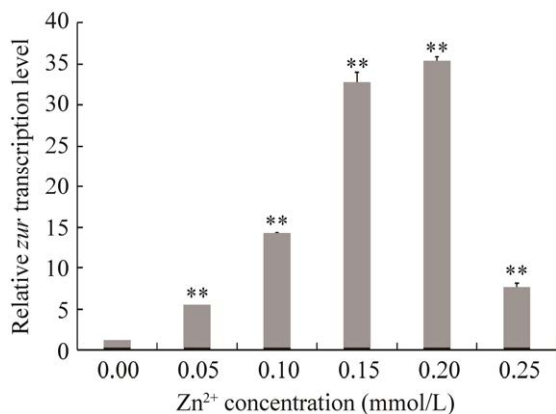


图 6 *zur* 基因在不同外源 Zn^{2+} 浓度诱导条件下的表达水平 **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t 检验)

Figure 6 Expression levels of *zur* induced by different exogenous Zn^{2+} concentrations. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t -test).

编码基因的 mRNA 水平, 从而降低突变株 Δzur 的胞外水解酶表达水平。

2.9 *zur* 基因缺失显著削弱大豆斑疹病菌的 EPS 合成

为探究 *zur* 基因是否参与 *Xag* 的 EPS 合成, 首先定性分析突变株 Δzur 、互补子 $C\Delta zur$ 及野生型菌株的 EPS 合成。在含 2% 葡萄糖(或蔗糖)的 NY 平板上, 相较于 $C\Delta zur$ 和野生型菌株, 突变株 Δzur 所形成菌落的大小、隆起和光滑度等有明显差异(图 8A), 提示 *zur* 基因可能参与 *Xag* 的 EPS 合成。为精准评估 *zur* 基因在 *Xag* 合成 EPS 中的作用, 定量测定各试验菌株的 EPS 产量。相较于野生型菌株, 突变株 Δzur 的 EPS 产

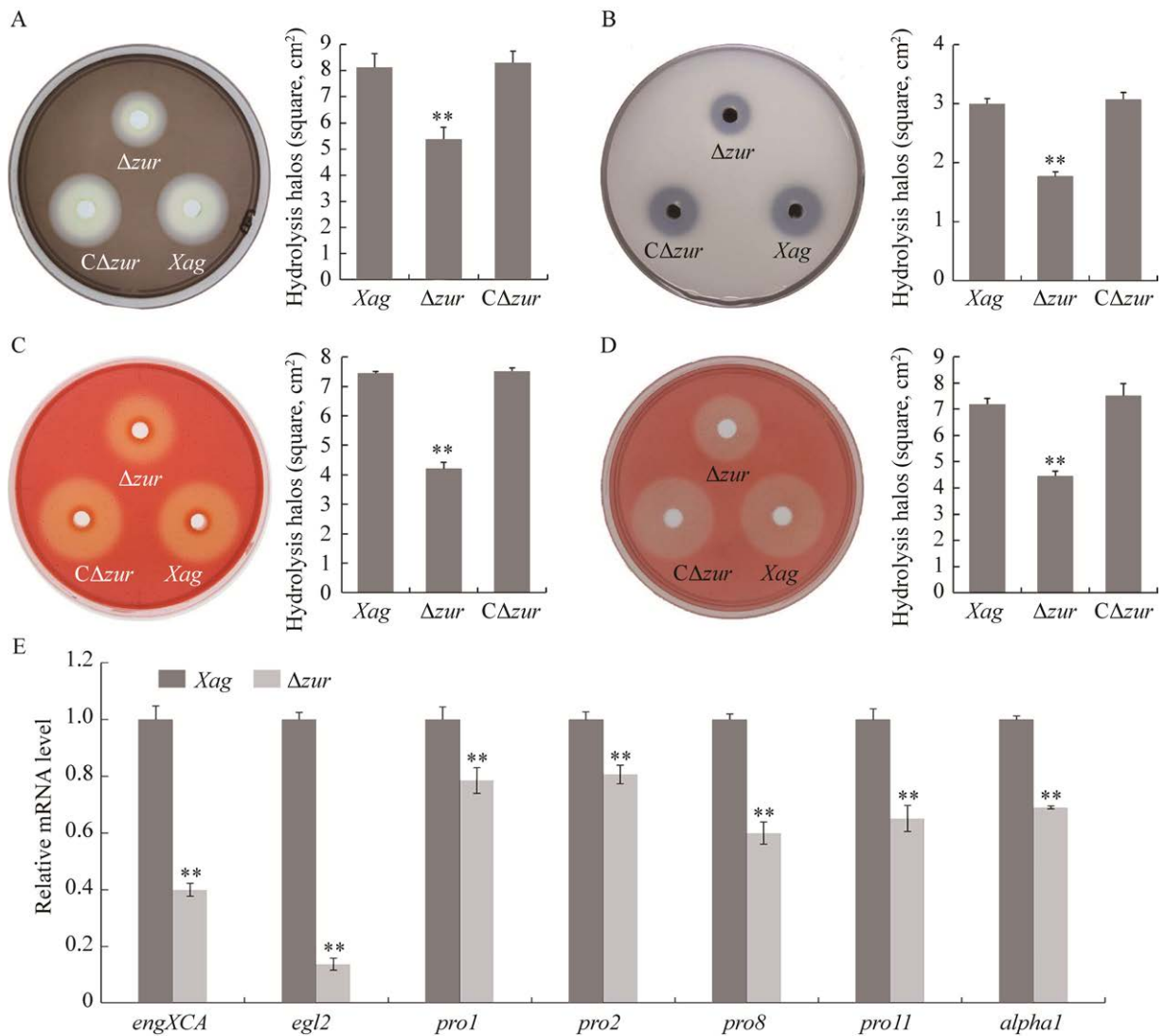


图7 突变株 Δzur 的胞外水解酶表达水平 A-D: 依次是胞外淀粉酶、胞外蛋白酶、胞外纤维素酶和内切葡聚糖酶的表达分析. E: 胞外水解酶编码基因的表达水平. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t 检验)

Figure 7 Expression level of Δzur in extracellular hydrolase. A-D: Expression analysis of extracellular amylase, extracellular protease, extracellular cellulase, and endo-glucanase, respectively. E: The expression level of extracellular hydrolases-related genes. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (t -test).

量减少了约 60%; 功能互补可将突变株 Δzur 的 EPS 产量恢复至野生型水平(图 8B)。这些结果表明, zur 基因是 Xag 合成 EPS 所需的。

为解析 zur 基因缺失削弱 Xag 合成 EPS 的原因, 利用荧光定量 PCR 分析 EPS 合成相关基因的表达水平。结果显示, 相较于在野生型菌株中, 负责 EPS 合成的 gum 基因簇代表

性基因($gumB$ 、 $gumD$ 、 $gumK$ 、 $gumM$ 、 $gumG$ 和 $gumH$)在突变株 Δzur 中的表达水平均大幅下调; 其中 $gumB$ 、 $gumD$ 和 $gumK$ 基因的表达量下调最为显著, 降低了 50%以上(图 8C)。这表明 zur 基因突变大幅下调 gum 基因簇代表性基因的表达, 从而削弱突变株 Δzur 合成 EPS 的能力。

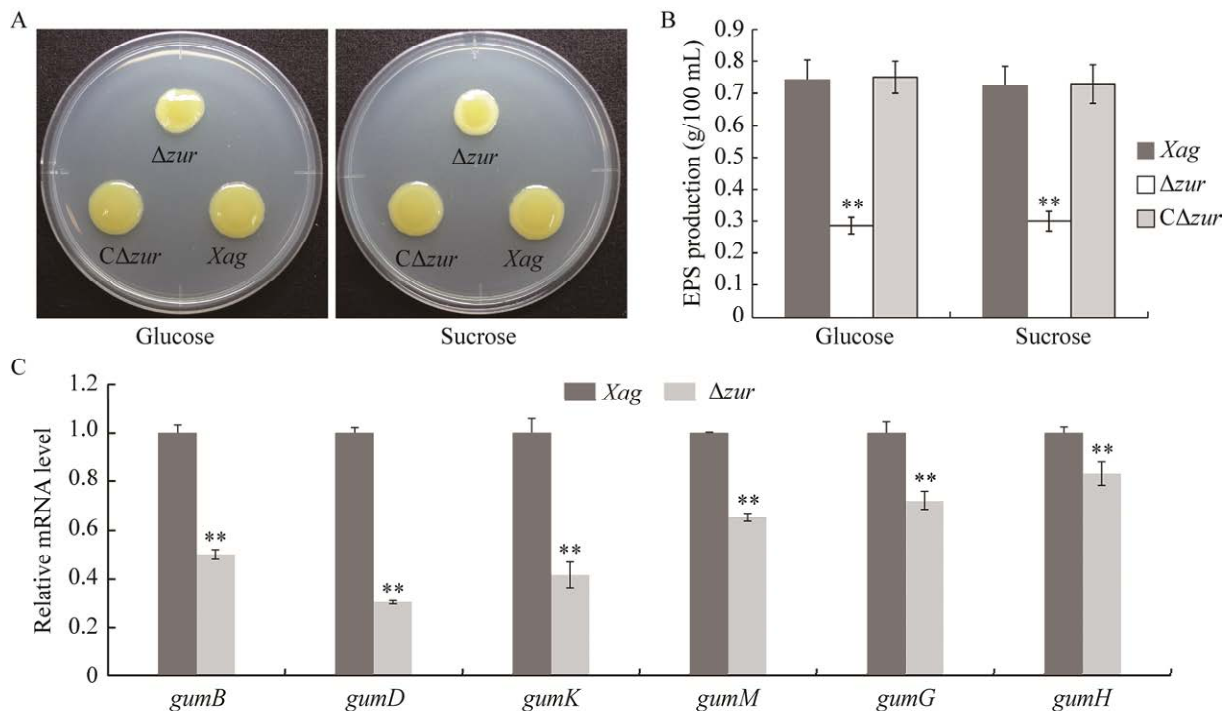


图 8 突变株 Δzur 合成 EPS 的能力 A: 定性分析 EPS 产量. B: 定量测定 EPS 产量. C: *gum* 基因簇代表性基因的表达水平. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (*t* 检验)

Figure 8 The ability of Δzur to synthesize EPS. A: Qualitative analysis of EPS yield. B: Quantitative analysis of EPS yield. C: The expression level of representative genes in *gum* gene cluster. **: $P < 0.01$; $n = 3$ (*t*-test).

3 讨论与结论

锌是细胞生物必需的微量元素,对多种重要蛋白的结构稳定性和催化活性至关重要。然而,锌摄取过量会抑制呼吸链 NADH 氧化酶的活性,从而毒害细胞。为了生存,细胞必须精准感知并严格调节胞内的 Zn^{2+} 浓度。由 *zur* 基因编码的锌吸收调控蛋白在细菌中普遍存在,是其胞内重要的锌稳态调节子^[7,26]。*zur* 基因在 *Xag* 菌株 8ra (1980 年分离自美国爱荷华州)、12-2 (1992 年分离自泰国)和 ZJ15 (2015 年分离自中国浙江省)中,具有 100% 的 DNA 序列相似性^[27]。此外,*zur* 基因在 6 种主要植物病原黄单胞菌(*Xag*、*Xoo*、*Xoc*、*Xcc*、*Xac* 和 *Xcv*)中,均保持 90% 以上的 DNA 序列相似性。这说明 *zur*

基因在植物病原黄单胞菌应对环境及寄主植物选择时,可能具有进化保守性。

尽管 *zur* 基因在不同植物病原黄单胞菌中的序列高度保守,但其在各菌株或生理小种中的功能差异较大^[16,18,28]。在 *Xag* ZJ15 菌株中,*zur* 基因表现出多样化的功能,除了具有在其他植物病原黄单胞菌中已报道的如参与 EPS 合成、调节金属离子耐受性、维持锌稳态以及在寄主植物上的致病性外,还参与菌株的胞外水解酶表达、在非寄主(烟草、番茄、辣椒和茄子)上激发 HR 能力等^[16,28]。在黄单胞菌毒性因子表达调控网络中,*zur* 基因位于全局性转录子 Clp 的下游,接收 Clp 的转导信号以调控下游基因的表达,从而影响菌株的多种生物学功能^[3,17]。Clp 在不同植物病原黄单胞菌中呈现出多样化

的生物学特性^[5],可能是导致 *zur* 基因功能差异化的根本原因。

植物病原黄单胞菌借助II型分泌系统(type II secretion system, T2SS)将多种胞外水解酶(如胞外淀粉酶、胞外蛋白酶等)分泌至胞外,瓦解植物细胞屏障以促进病原菌感染^[29]。在 *Xag* 中, *zur* 基因突变大幅降低菌株的胞外水解酶表达,同时影响 T3SS 的功能,削弱菌株在非寄主植物上激发 HR 的能力。然而,在 *Xoo* 和 *Xcc* 中, Zur 仅调控菌株的 T3SS 表达,但不参与菌株的胞外水解酶表达或 T2SS 功能^[16,18]。这些结果提示 Zur 在不同植物病原黄单胞菌中的调控机制存在差异,未来可进一步探究其在 T2SS 与 T3SS 功能交互中的作用。

Xag ZJ15 菌株铁摄取因子 PiuB 失活,增强菌株对 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的敏感性^[30]。本研究发现 Zur 失活不仅显著增强 *Xag* 对 Zn^{2+} 的敏感性,还表现出对 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 的极高响应,推测 *Xag* 对 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 耐受性的信号转导通路可能存在交叉或部分重叠。有意思的是,在 *Xoo* PXO99^A 菌株中, *zur* 基因突变株表现出对 Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 的敏感性,但对 Cu^{2+} 不敏感^[16]; *Xcc* 8004 菌株的 Zur 失活,却仅对 Zn^{2+} 敏感^[28]。推测不同植物病原黄单胞菌对金属离子耐受性的信号转导通路,可能存在差异性 or 相对独立性。Zur 作为锌摄取调控子,受锌诱导激活后可结合到 Zn^{2+} 平衡相关基因的启动子区,直接调控其表达以维持胞内锌稳态^[31],但其却依赖 *hrpX* 间接调控 *hrp* 基因簇表达^[18-19,22],这揭示了 Zur 调控下游基因表达方式的多样性。植物病原黄单胞菌的 EPS 合成和胞外水解酶表达可能受众多转录因子或信号转导通路所调控^[16-18],由相关研究推测, *Xcc* 的 EPS 合成相关基因可能受 Zur 直接调控,而胞外水解酶编码基因表达则间接或不受 Zur 调控^[3]。 *Xag* 或其他黄单胞菌的 Zur

是如何调控该类基因表达的,需进一步研究。

虽然 *zur* 基因在不同植物病原黄单胞菌中的功能差异显著,但其突变均能大幅降低菌株在寄主植物上的致病力^[16,18,28],这揭示了 *zur* 基因在黄单胞菌与感病寄主植物互动中的重要性。*zur* 基因突变显著削弱在寄主大豆上的致病性,其可能是源于突变株 EPS 合成减少、胞外水解酶与 *hrp* 基因表达降低以及离子敏感性增强等多种因素协同作用的结果。*zur* 基因是否还有其他方面的生物学功能,特别是在黄单胞菌与(非)寄主植物互动方面,仍需进一步研究。总之,本研究拓宽了植物病原黄单胞菌 Zur 的功能谱及调控网络,为黄单胞菌与植物互动共进化理论提供了参考。

REFERENCES

- [1] RYAN RP, VORHÖLTER FJ, POTNIS N, JONES JB, van SLUYS MA, BOGDANOVA AJ, DOW JM. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(5): 344-355.
- [2] JACQUES MA, ARLAT M, BOULANGER A, BOUREAU T, CARRÈRE S, CESBRON S, CHEN NWG, COCIANCICH S, DARRASSE A, DENANCÉ N, SAUX MFL, GAGNEVIN L, KOEBNIK R, LAUBER E, NOËL LD, PIERETTI I, PORTIER P, PRUVOST O, RIEUX A, ROBÈNE I, et al. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2016, 54: 163-187.
- [3] BÜTTNER D, BONAS U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(2): 107-133.
- [4] TIMILSINA S, POTNIS N, NEWBERRY EA, LIYANAPATHIRANAGE P, IRUEGAS-BOCARD O F, WHITE FF, GOSS EM, JONES JB. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(8): 415-427.
- [5] GUO W, GAO J, CHEN QS, MA BJ, FANG Y, LIU X, CHEN GY, LIU JZ. Crp-like protein plays both

- positive and negative roles in regulating the pathogenicity of bacterial pustule pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*[J]. *Phytopathology*, 2019, 109(7): 1171-1183.
- [6] CHATNAPARAT T, PRATHUANGWONG S, LINDOW SE. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(6): 508-522.
- [7] LYU MY, CHENG YQ, DAI YJ, WEN Y, SONG Y, LI JL, CHEN Z. Zinc-responsive regulator Zur regulates zinc homeostasis, secondary metabolism, and morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(7): e0027822.
- [8] LIU ZQ, XU ZR, CHEN SZ, HUANG JH, LI T, DUAN C, ZHANG LH, XU ZL. CzcR is essential for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa* during zinc stress[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0284622.
- [9] KALLIFIDAS D, PASCOE B, OWEN GA, STRAIN-DAMERELL CM, HONG HJ, PAGET MSB. The zinc-responsive regulator Zur controls expression of the coelibactin gene cluster in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2): 608-611.
- [10] DJOKO KY, ONG CLY, WALKER MJ, MCEWAN AG. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(31): 18954-18961.
- [11] XUE Q, KANG R, KLIONSKY DJ, TANG DL, LIU JB, CHEN X. Copper metabolism in cell death and autophagy[J]. *Autophagy*, 2023, 19(8): 2175-2195.
- [12] LI XH, CHEN L, WANG YK, GUO X, HE ZG. Zinc excess impairs *Mycobacterium bovis* growth through triggering a Zur-IdeR-iron homeostasis signal pathway[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(5): e0106923.
- [13] KANDARI D, JOSHI H, BHATNAGAR R. Zur: zinc-sensing transcriptional regulator in a diverse set of bacterial species[J]. *Pathogens*, 2021, 10(3): 344.
- [14] FILLAT MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 546: 41-52.
- [15] AJIBOYE TO, SKIEBE E, WILHARM G. Impact of zinc uptake regulator Zur on the susceptibility and oxidative stress response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2019, 53(4): 467-473.
- [16] YANG WF, LIU Y, CHEN L, GAO TC, HU BS, ZHANG DF, LIU FQ. Zinc uptake regulator (*zur*) gene involved in zinc homeostasis and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice[J]. *Current Microbiology*, 2007, 54(4): 307-314.
- [17] HE YW, NG AYJ, XU M, LIN K, WANG LH, DONG YH, ZHANG LH. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(2): 281-292.
- [18] HUANG DL, TANG DJ, LIAO Q, LI XQ, HE YQ, FENG JX, JIANG BL, LU GT, TANG JL. The Zur of *Xanthomonas campestris* is involved in hypersensitive response and positively regulates the expression of the *hrp* cluster via *hrpX* but not *hrpG*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(3): 321-329.
- [19] 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.
- [20] DEAN P. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(6): 1100-1125.
- [21] CHAO NX, WEI K, CHEN Q, MENG QL, TANG DJ, HE YQ, LU GT, JIANG BL, LIANG XX, FENG JX, CHEN BS, TANG JL. The *rsmA*-like gene *rsmA_{xcc}* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is involved in the control of various cellular processes, including pathogenesis[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(4): 411-423.
- [22] 张翠萍, 阎依超, 李逸朗, 杨瑞环, 李生樟, 黄梦桑, 邹丽芳, 陈功友. 水稻白叶枯病菌 Zur 和 HrpG 平行调控 *hrcC* 基因表达[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(5): 574-583.
- ZHANG CP, YAN YC, LI YL, YANG RH, LI SZ, HUANG MS, ZOU LF, CHEN GY. Zur regulates *hrcC* gene expression in parallel with HrpG in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*,

2020, 50(5): 574-583 (in Chinese).

- [23] WANG T, LI YJ, LI J, ZHANG DZ, CAI NY, ZHAO GH, MA HK, SHANG C, MA Q, XU QY, CHEN N. An update of the suicide plasmid-mediated genome editing system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(5): 907-919.
- [24] 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.
- [25] 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).
- [26] MIKHAYLINA A, KSIBE AZ, SCANLAN DJ, BLINDAUER CA. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(4): 983-1001.
- [27] CARPENTER SCD, KLADSUWAN L, HAN SW, PRATHUANGWONG S, BOGDANOVA AJ. Complete genome sequences of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates from the United States and Thailand reveal conserved transcription activator-like effectors[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, 11(5): 1380-1384.
- [28] TANG DJ, LI XJ, HE YQ, FENG JX, CHEN BS, TANG JL. The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(7): 652-658.
- [29] SOLÉ M, SCHEIBNER F, HOFFMEISTER AK, HARTMANN N, HAUSE G, ROTHER A, JORDAN M, LAUTIER M, ARLAT M, BÜTTNER D. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(17): 2879-2893.
- [30] 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 RY, JIN LJ, XU JL, GENG HY, CHEN X, LIN SY, GUO W, JI ZY. 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 (in Chinese).
- [31] LIU FM, SU ZH, CHEN P, TIAN XL, WU LJ, TANG DJ, LI PF, DENG HT, DING PF, FU Q, TANG JL, MING ZH. Structural basis for zinc-induced activation of a zinc uptake transcriptional regulator[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(11): 6511-6528.

(本文责编 郝丽芳)