北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

欧美杨细菌性溃疡病菌铁锰转运基因功能解析

曾莎 杨瑞睿 明泽旭 李爱宁

Functional analysis of Fe-Mn transporter genes in *Lonsdalea populi*

Zeng Sha, Yang Ruirui, Ming Zexu, Li Aining

引用本文:
曾莎, 杨瑞睿, 明泽旭, 李爱宁. 欧美杨细菌性溃疡病菌铁锰转运基因功能解析[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(1):50–61. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250241
Zeng Sha, Yang Ruirui, Ming Zexu, Li Aining. Functional analysis of Fe–Mn transporter genes in *Lonsdalea populi*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(1):50–61. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250241

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250241

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

欧美杨细菌性溃疡病菌双组分基因缺失突变及其生物学表型分析
Deletion mutations and its phenotypic analysis of two–component genes in *Lonsdalea populi*
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 25–37. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210007

果生炭疽菌转录因子CfHac1的BRLZ结构域生物学功能研究
Functional analysis of BRLZ motif of the transcription factor CfHac1 in *Colletotrichum fructicola*
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 70–76. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210087

山新杨谷胱甘肽S–转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析
Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S–transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 68–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240020

西府海棠微丝结合蛋白MmADF1和MmADF11抵御病菌侵染机制
Mechanism of microfilament–binding proteins MmADF1 and MmADF11 against pathogen infection in *Malus micromalus*
北京林业大学学报, 2025, 47(8): 10–22. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240177

松材线虫效应因子基因筛选及*Bx–Hh–grl*功能研究
Screening of effector genes of *Bursaphelenchus xylophilus* and the function of *Bx–Hh–grl*
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 87–93. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210002

山新杨*PdaGLK*1基因在盐胁迫响应中的功能研究
Functional study of *PdaGLK*1 gene in salt stress response of *Populus davidiana* × *Populus alba* var. *pyramidalis*
北京林业大学学报, 2025, 47(7): 11–20. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240440

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250241

欧美杨细菌性溃疡病菌铁−锰转运基因功能解析

曾 莎 杨瑞睿 明泽旭 李爱宁
（北京林业大学林学院，林木有害生物防治北京市重点实验室，北京 100083）

摘要:【目的】本研究旨在解析欧美杨细菌性溃疡病菌（*Lonsdalea populi*）铁−锰转运系统 SitABCD 编码基因（*sitA*、*sitB*、*sitC*、*sitD*）在致病过程中的生物学功能。**【方法】**以 *L. populi* N-5-1 为研究对象，采用生物信息学方法鉴定 SitABCD 系统组分的编码基因，利用遗传转化技术，分别针对 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 4 个基因，构建了其缺失突变体、互补菌株以及过表达菌株。以 N-5-1 为对照，比较各菌株在致病性、生长速率、游动性、生物膜形成及抗氧化胁迫等表型的差异。然后，采用 RT-qPCR 技术定量分析过表达菌株中氧化应激防御关键基因 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 的表达水平。**【结果】**研究获得了 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 4 个基因的相应缺失突变体、互补菌株及过表达菌株。与 N-5-1 相比，各缺失突变体在致病性、生长、游动性、生物膜形成及抗氧化胁迫均未表现出显著差异；然而，过表达 *sitA*、*sitB*、*sitC* 或 *sitD* 菌株表现出显著的表型变化，除菌株游动能力未受影响外，在 107 杨茎干上的致病力显著减弱，在铁−锰限制条件下，生长速率显著下降，生物膜形成能力和氧化应激耐受性明显降低，且氧化应激防御基因（*sodA*、*ahpC*、*katA*）表达下调。**【结论】**单个敲除欧美杨细菌性溃疡病菌 SitABCD 转运系统的组成基因未影响致病性，但过表达后，则显著影响致病性，表明 SitABCD 系统的精确表达对病原菌致病过程至关重要。本研究为阐明欧美杨细菌性溃疡病菌致病机制提供了新视角。

关键词：欧美杨细菌性溃疡病菌；铁−锰转运系统；SitABCD；致病性
中图分类号：S763.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2026)01−0050−12
引文格式：曾莎，杨瑞睿，明泽旭，等. 欧美杨细菌性溃疡病菌铁−锰转运基因功能解析［J］. 北京林业大学学报，2026，48(1)：50−61. Zeng Sha, Yang Ruirui, Ming Zexu, et al. Functional analysis of Fe-Mn transporter genes in *Lonsdalea populi*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(1): 50−61.

Functional analysis of Fe-Mn transporter genes in *Lonsdalea populi*

Zeng Sha Yang Ruirui Ming Zexu Li Aining
(School of Forestry, Key Laboratory of Beijing for the Control of Forest Pests, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: ［**Objective**］ This study aimed to elucidate the pathogenic function of Fe-Mn transporter SitABCD-encoding genes (*sitA*, *sitB*, *sitC*, *sitD*) in *Lonsdalea populi*. ［**Method**］ Based on the genome of *L. populi* N-5-1 strain, the genes encoding the components of SitABCD system were identified, and for each of the 4 genes (*sitA*, *sitB*, *sitC* and *sitD*), its knockout mutants, complemented strains and overexpression strains were constructed via homologous recombination. Phenotypes including pathogenicity on stems of *Populus* × *euramericana* ‘107’, growth rate, swimming motility, biofilm formation and resistance to oxidative stress were analyzed and compared with N-5-1. RT-qPCR was employed to quantify transcript levels of oxidative-stress defense genes *sodA*, *ahpC* and *katA* in overexpression strains. ［**Result**］ The corresponding knockout mutants, complemented strains and overexpression strains for each of the 4 genes (*sitA*, *sitB*, *sitC* and *sitD*)

收稿日期: 2025−06−26 **修回日期:** 2025−12−20
基金项目: 国家自然科学基金项目 (32271887)。
第一作者: 曾莎。主要研究方向：林木病理学。Email: zengsha@bjfu.edu.cn 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 李爱宁，副教授。主要研究方向：林木病理学。Email: li_aining@bjfu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

were successfully generated. No significant phenotypic differences were observed between deletion mutants and N-5-1 with respect to pathogenicity, growth, motility, biofilm formation or oxidative-stress tolerance. In contrast, the overexpression strains exhibited marked changes: virulence on stems of *Populus* × *euramericana* '107' was significantly attenuated, growth under Fe-Mn-limiting conditions was impaired, biofilm biomass and oxidative-stress resistance were reduced, and transcript levels of *sodA*, *ahpC* and *katA* were down-regulated, whereas swimming motility remained unaffected. [**Conclusion**] It was demonstrated that individual knockout of the genes encoding the SitABCD system in *L. populi* did not affect pathogenicity, but overexpression significantly impaired it, indicating that the precise expression of the SitABCD system is crucial for the pathogenesis of this bacterium. This study provides new insight into the pathogenic mechanism of *Lonsdalea populi*.

Key words: *Lonsdalea populi*; Fe-Mn transporter system; SitABCD; pathogenicity

杨树(*Populus* spp.)是全球范围内重要的造林树种，被广泛应用于国土绿化、木材加工、造纸工业及生物能源生产等领域[1–2]。我国在美洲黑杨(*Populus deltoides*)等杨树种质资源的创制方面已取得关键进展[3]，与此同时，林木育种技术正加速向智能分子设计方向演进[4]，从而对培育兼具高效应抗病性的新品种提出了更为迫切的需求。其中，欧美杨(*Populus* × *euramericana*)作为美洲黑杨(*P. deltoides*)和欧洲黑杨(*P. nigra*)的杂交品种，因其速生性和广泛适应性，在景观绿化和工业原料林中占据重要地位[5–6]。然而，由欧美杨细菌性溃疡病菌(*Lonsdalea populi*)引起的溃疡病严重威胁欧美杨林[2]。该病害最早于 2006 年在我国欧美杨人工林中被报道[7]，主要危害 2 年生左右的欧美杨枝干，初期症状为树皮开裂，随后裂缝扩展至木质部，并伴有泡沫状液体渗出，散发腐臭味[6]。严重时，受感染的杨树可能会死亡或容易被风吹折[2]。调查发现，该病害在欧美杨无性系(如'中林 46')中危害尤为严重，发病率高达 70% 以上，严重威胁欧美杨林的健康及可持续发展[2, 8]。因此，阐明该病原菌的致病机制是利用现代育种技术实现抗病突破、保障产业健康发展的前提。

L. populi 的基因组分析揭示了多种毒力相关基因，包括植物细胞壁降解酶(果胶酶、纤维素酶)以及效应蛋白分泌系统(T3SS/T6SS)等相关基因[9–10]。此外，该细菌的致病性还与其在宿主体内的环境适应能力密切相关，其中金属离子稳态调控尤为关键。宿主通过"营养免疫"策略，主动限制金属离子的可利用性以抑制病原菌；铁(Fe)和锰(Mn)作为参与电子传递链和酶活调控的必需微量元素，在病原菌–宿主互作中具有双重作用，既是代谢必需物质，又可能因过量积累而引发细胞毒性。因此，精密调控金属离子转运系统已成为病原菌突破宿主营养免疫屏障、成功定殖的关键策略[11]。以水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*，Xoo)为例，其 FeoB 铁摄取系统在细菌定殖和致病过程中发挥不可或缺的作用，是该菌的 1 个关键毒力因子[12]。尽管 Xoo 与 *L. populi* 分别侵染水稻(*Oryza sativa*)维管系统和杨树木质部，但同为革兰氏阴性病原菌，它们很可能采用类似的金属离子适应机制，以克服宿主的营养免疫防御。上述研究为探索 *L. populi* 中金属离子转运系统功能提供了直接的理论参考。

在众多金属离子转运系统中，SitABCD 是一种广泛存在于革兰氏阴性菌中的高亲和力 Fe^{2+}-Mn^{2+}转运系统，能够在低铁环境下将 Fe^{2+}或 Mn^{2+}转运至细胞内，由 4 个基因组成：*sitA* 编码周质结合蛋白，*sitB* 编码 ATP 结合蛋白，*sitC* 和 *sitD* 分别编码 1 个跨膜蛋白[13]。研究表明，SitABCD 系统在细菌的环境适应性和宿主互作中发挥关键作用。例如，在豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)中，SitABCD 与 MntH 共同构成主要的锰转运系统，其功能缺失导致细菌在低锰条件下生长严重受限，并丧失固氮能力[14]。而在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中，SitABCD 受 Fur 蛋白调控，其表达失调会导致锰稳态失衡和毒力减弱[15]。这些研究结果凸显了 SitABCD 系统在细菌–宿主相互作用中的重要性。然而，目前对 *L. populi* 致病机制的研究主要集中在如 KdpD-KdpE[16]、DcuS-DcuR[17]和 CpxA-CpxR[18]等双组分系统上，而关于其金属离子转运系统，特别是 SitABCD 系统功能研究尚属空白。该系统在杨树互作中的适应性调控功能与具体作用机制均有待揭示。

本研究针对 *L. populi* 的 SitABCD 系统开展功能解析，通过遗传转化获得缺失突变体和过表达菌株，分析了不同菌株的致病性、金属离子胁迫响应、生物膜形成及氧化胁迫的表型差异，旨在阐明 SitABCD 系统在致病过程中的作用机制，为深入理解该病原菌的致病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、质粒和生长条件

本研究采用的菌株是 N-5-1，该菌株分离于发生溃疡病的欧美杨枝条，并保存在林木有害生物防治北京市重点实验室林木病理学实验室[2]。以该菌株为受体，通过遗传操作获得各衍生菌株均在 Luria-Bertani（LB）培养基中进行培养，培养条件为 30 ℃、48 h。自杀载体 pWM91 在 LB 培养基中 37 ℃ 培养 24 h，大肠杆菌在相同条件下培养 16 h。根据实验需要，培养基中分别添加了以下抗生素：利福平（50 μg/mL）、氨苄青霉素（100 μg/mL）、大观霉素（25 μg/mL）以及氯霉素（17 μg/mL）。本研究使用的所有菌株和质粒均保存于实验室，详细信息见表 1。

1.2 细菌突变体和过表达菌株构建

基因缺失突变体与过表达菌株的构建采用本实验室成熟方案[19]。对于缺失突变体，以 N-5-1 基因组 DNA 为模板，通过 PCR 扩增各目的基因的上下游同源臂片段。利用重叠延伸 PCR（SOE-PCR）技术将上下游片段融合，所得产物经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后，与经相同酶切处理的 pWM91 自杀载体连接，构建重组质粒。将 N-5-1 与携带该重组质粒的大肠杆菌 BW20676（S17-1λpir）进行接合。接合后，取菌液涂布于含利福平（50 μg/mL）和氨苄青霉素（100 μg/mL）的 LB 平板上，筛选发生第 1 次单交换的重组子；随后，将阳性克隆在含 10% 蔗糖的 LB 平板上进行第 2 次交换筛选，获得基因缺失突变株。采用目的基因特异性引物（1F/2R），通过菌落 PCR 对突变株进行验证。对于过表达菌株，以野生型菌株 DNA 为模板，采用引物 *sitA*-3F/3R、*sitB*-3F/3R、*sitC*-3F/3R 和 *sitD*-3F/3R 分别扩增各基因的完整编码序列。PCR 产物经 *Xba*I 和 *Hind*III 双酶切后，与经相同酶切处理的 pBBR1MCS2 载体连接，构建重组表达质粒。将各重组表达质粒通过电转化导入 N-5-1 菌株中，转化子涂布于含卡那霉素（50 μg/mL）的平板上筛选。通过菌落 PCR 和质粒酶切对重组质粒进行鉴定，并采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测靶基因转录水平，确认过表达成功。相关引物序列信息见表 2。

1.3 致病性分析

将待测菌株接种于含 50 μg/mL 利福平的 LB 液体培养基中，于 30 ℃ 摇床培养 48 h，并将菌液浓度

表 1 细菌菌株和质粒

Tab. 1 Bacterial strains and plasmids

项目		描述	来源
菌株	*Lonsdalea populi* N-5-1	野生型欧美杨溃疡病病原菌；Rif^R	实验室保藏
	Escherichia coli S17-1λpir	接合转移供体菌株	宝生物公司
	Δ*sitA*	*sitA*基因缺失突变体；Rif^R	本研究
	Δ*sitB*	*sitB*基因缺失突变体；Rif^R	
	Δ*sitC*	*sitC*基因缺失突变体；Rif^R	
	Δ*sitD*	*sitD*基因缺失突变体；Rif^R	
	Δ*sitA-sitA*	Δ*sitA*突变体携带回补质粒pBBR1MCS2::*sitA*；Kan^R	
	Δ*sitB-sitB*	Δ*sitB*突变体携带回补质粒pBBR1MCS2::*sitB*；Kan^R	
	Δ*sitC-sitC*	Δ*sitC*突变体携带回补质粒pBBR1MCS2::*sitC*；Kan^R	
	Δ*sitD-sitD*	Δ*sitD*突变体携带回补质粒pBBR1MCS2::*sitD*；Kan^R	
	Δ*sitA-BV*	Δ*sitA*突变体携带空质粒pBBR1MCS2；Kan^R	
	Δ*sitB-BV*	Δ*sitB*突变体携带空质粒pBBR1MCS2；Kan^R	
	Δ*sitC-BV*	Δ*sitC*突变体携带空质粒pBBR1MCS2；Kan^R	
	Δ*sitD-BV*	Δ*sitD*突变体携带空质粒pBBR1MCS2；Kan^R	
	OE-*sitA*	野生型菌株携带过表达质粒pBBR1MCS2::*sitA*；Kan^R	
	OE-*sitB*	野生型菌株携带过表达质粒pBBR1MCS2::*sitB*；Kan^R	
	OE-*sitC*	野生型菌株携带过表达质粒pBBR1MCS2::*sitC*；Kan^R	
	OE-*sitD*	野生型菌株携带过表达质粒pBBR1MCS2::*sitD*；Kan^R	
质粒	pWM91	用于构建基因缺失突变体的自杀载体；Amp^R	实验室保藏
	pBBR1MCS2	广宿主谱克隆载体；Kan^R	

注：Rif^R、Kan^R、Amp^R 分别表示利福平、卡那霉素、氨苄青霉素抗性。

调整至 OD_{600} = 0.4。选取生长健康的 2 年生欧美杨 107 枝条，经流水充分冲洗后，使用 75% 酒精进行表面消毒处理，截取 30 cm 长的茎段备用。在枝条中部位置，用灭菌刀片划出十字形伤口（深度至木质部），接种 200 μL 菌悬液。实验设置阳性对照（接种 N-5-1 菌悬液）和阴性对照（接种 LB 液体培养基）。接种完成后，采用湿润的无菌脱脂棉覆盖创面，外覆保鲜膜维持湿度环境。所有处理后的材料置于人工气候箱中培养，参数设定为 30 ℃ 恒温、90% 相对湿度，以及 12 h 光暗交替周期。3 d 后去除保湿材料，9 d 后剥离树皮，测量并记录木质部损伤长度。病害严重程度按以下标准分级：0 级：接种处无病斑，可见愈伤组织形成；1 级：接种处树皮变软、凹陷或发黑，可见溃疡但无菌脓，病斑长度 < 1.0 cm；2 级：接种处明显溃疡，伴随树皮腐烂或白色脓状物流出，病斑长度 1.1 ~ 2.0 cm；3 级：接种处大面积溃烂，有乳白色菌脓流出，散发特殊臭味，病斑长度 2.1 ~ 3.0 cm；4 级：接种处深陷溃烂，伴随褐色菌脓，腐臭味浓烈，病斑长度 > 3.0 cm。病情指数按公式计算：病情指数 = 100 × ∑（各级病枝数 × 各级代表值）/（调查总枝条数 × 最高级代表值），并进行差异显著性分析。每个菌株处理设置 5 次生物学重复，实验独立重复 3 次。

1.4　生长状况测定

将待测菌株接种于 LB 培养基中，于 30 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h 后，将菌液浓度调整至 OD_{600} = 0.4。随后，将菌悬液以 1∶100 的比例转接至新鲜 LB 或补充 $FeSO_4$/$MnSO_4$ 的 M9 培养基中，并在相同条件下（30 ℃、200 r/min）继续培养。每隔 6 h 测定 OD_{600} 值，监测生长动态，直至各菌株进入稳定期。实验独立重复 3 次。

1.5　游动性测定

菌株游动能力采用半固体琼脂平板法测定[20]。将待测菌株接种于 LB 液体培养基中，于 30 ℃、200 r/min 条件下培养，随后将菌液浓度调整至 OD_{600} = 0.4。用无菌牙签将菌液点接于含 0.3% 琼脂的半固体 LB 培养基平板中央，于 30 ℃ 恒温箱中正置培养 48 h 后，测量并记录各菌株游动圈的直径。每个菌株设置 6 个生物学重复，实验独立重复 3 次。

1.6　生物膜形成能力测定

生物膜的定量分析采用结晶紫染色法。将待测菌株接种于 LB 培养基中，于 30 ℃、200 r/min 中培养 48 h，并将菌液浓度调整至 OD_{600} = 0.4。取 200 μL 菌悬液加入 96 孔板中，于 30 ℃ 静置培养 48 h，使用 Infinite 200 Pro 多功能酶标仪（Tecan, Switzerland）测定 590 nm 波长下的吸光度（OD_{590}）。随后，弃去菌液，用无菌水洗涤 3 次，室温干燥。每孔加入 220 μL 1% 结晶紫溶液，室温染色 30 min。移除染色液后，用无菌水洗涤 2 次以去除残留染液。最后，向各孔加入 240 μL 95% 乙醇溶解生物膜，再次使用酶标仪测定 600 nm 处吸光度（OD_{600}）。以 OD_{590}/OD_{600} 表示生物膜形成能力，每个菌株设置 8 个生物学重复，实验独立重复 3 次。

1.7　氧化应激及抗生素敏感性测定

过氧化氢及抗生素敏感性测定参照已有方法进行[21]。将待测菌株接种于 LB 液体培养基，在 30 ℃、200 r/min 条件下进行孵育 48 h，并将菌液浓度调整至 OD_{600} = 0.4。取 900 μL 菌悬液加入 50 mL LB 培养基中制成平板，在平板中央放置无菌滤纸片，并分别滴加 5 μL 5% H_2O_2、3 μL 氯霉素（17 mg/mL）或 1 μL 大观霉素（25 mg/mL）。将平板置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h，随后测定抑菌圈直径并拍照。每个菌株处理设置 5 个生物学重复，实验独立重复 3 次。

1.8　RT-qPCR 分析

采用 Tiangen RNAprep Pure Bacteria Kit 提取细菌总 RNA，所有操作均严格遵循制造商说明书进行。提取后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整度及纯度。随后，使用 FastKing RT Kit（含 DNase I）试剂盒，将 RNA 反转录为 cDNA。为排除基因组 DNA 污染，设置不加逆转录酶的阴性对照和基因组 DNA 阳性对照进行验证。RT-qPCR 在 ABI 7500 实时 PCR 系统（Applied Biosystems）上完成，采用 SuperReal PreMix Plus（SYBR Green，Tiangen）作为检测体系。以 16S rRNA 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。每个基因设置 5 个生物学重复，实验独立重复 3 次。

1.9　数据处理及分析

数据采用 IBM SPSS Statistics 27.0 进行统计分析。组间差异采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行整体检验，若结果显著，则进一步使用 Dunnett's 事后检验将所有实验菌株与野生型对照组（WT）进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　SitABCD 系统各组分生物信息学分析

通过对 N-5-1 的全基因组分析[22]，我们鉴定了 1 个由 *Lqp*13125、*Lqp*13120、*Lqp*13115 和 *Lqp*13110 基因组成的基因簇，该基因簇编码 Fe^{2+}-Mn^{2+}转运系统 SitABCD。其开放阅读框（ORF）长度及其编码的蛋白质结构域如下：*Lqp*13125 的 ORF 长度为 873 bp，编码 303 个氨基酸，包含 1 个典型的 PsaA 结构域；*Lqp*13120 的 ORF 长度为 903 bp，编码 300 个氨基

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

基因	序列(5′—3′)	用途
*Lqp*13125	1F: CGGGATCCCATCACAACATCCTCGACGAG 1R: GTTCGCTCTGATCGGGATAATGGAAGGATTATCTAGATAATG 2F: CATTATCTAGATAATCCTTCCATTATCCCGATCAGAGCGAAC 2R: CCGCTCGAGGAACCGCAAATGGTGAAGAAGAC	构建*sitA*缺失突变株
*Lqp*13120	1F: CGGGATCCGATTGCAAGCTGCAGCGTATC 1R: GATAATGAAACAGCGCAACCAAAAATGATCGCCAATCTG 2F: CAGATTGGCGATCATTTTTGGTTGCGCTGTTTCATTATC 2R: AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAATGCCGAGGCCTACAAAG	构建*sitB*缺失突变株
*Lqp*13115	1F: CGGGATCCGATCGAGATGAACCGACGAC 1R: CAAAAATGATCGCCAATCTGGTGACGCGATGAACATCGTC 2F: GACGATGTTCATCGCGTCACCAGATTGGCGATCATTTTTG 2R: CCGCTCGAGGTCAGGTCATCCTGCTTGAC	构建*sitC*缺失突变株
*Lqp*13110	1F: CGGGATCCGTTCGGATCACGAGCATCATG 1R: GATGAACATCGTCGACATACTCGTATGAGGCTTCGGCCCACTC 2F: GAGTGGGCCGAAGCCTCATACGAGTATGTCGACGATGTTCATC 2R: CCGCTCGAGGAGAACCATGCACGCTCTATC	构建*sitD*缺失突变株
C13125	3F: TCGACGGTATCGATAAGCTTCATTATCTAGATAATCCTTC 3R: GCGGTGGCGGCCGCTCTAGACTGATCGGGATAATGAGCACT	构建*sitA*过表达菌株
C13120	3F: TCGACGGTATCGATAAGCTTCAGATTGGCGATCATTTTTG 3R: GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAGATAATGAAACAGCGCAAC	构建*sitB*过表达菌株
C13115	3F: TCGACGGTATCGATAAGCTTGACGATGTTCATCGCGTCAC 3R: GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAGATCGCCAATCTGCTCGAG	构建*sitC*过表达菌株
C13110	3F: TCGACGGTATCGATAAGCTTGAGTGGGCCGAAGCCTCATAC 3R: GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAATGAACATCGTCGACATACTC	构建*sitD*过表达菌株
Q13125	CGAAAGCACCATCTCCGACA CTAGATAATCCTTCAGCCAAG	*sitA*的RT-qPCR检测
Q13120	GACCGGTGATACGTTTACAC GTGCGTTCTTTCAACACGATG	*sitB*的RT-qPCR检测
Q13115	CTTCTCATCATCGCAGTCGTC CTTTAGTGGCTCGTCGGTAAG	*sitC*的RT-qPCR检测
Q13110	GTTCAATACCATGTTAATCCTG GATGATGATTCTAATCGGGCAG	*sitD*的RT-qPCR检测
Q2516	GTCGTCAGCAATAACAATGTC GTGTAGCGGGTGATATCGTG	*katA*的RT-qPCR检测
Q2273	CCCGGCTGACTTTACGTTTG GGTTTTCGAAGTTACGCGTCAG	*ahpC*的RT-qPCR检测
Q2429	CTATGCCTATGACGCACTGGAAC CTTGTCAGCCGGAACCTGATC	*sodA*的RT-qPCR检测
16srRNA	ATGCCGCGTGTATGAAGAAG GCTTTACGCCCAGTCATTC	内参基因RT-qPCR检测
MCS1 MCS2	GGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	验证互补及过表达菌株
InfB 238 InfB 579	CTCTGCTAAATCGGGGACGG CACGAGCTTTCTTCTCGTCC	*Lonsdalea populi*专利引物
SacB1 SacB2	GGCTTGTATGGGCCAGTTAAAG GTCTTTGCATTAGCCGGAGATC	验证缺失突变体

注: 引物中的下划线表示酶切位点。

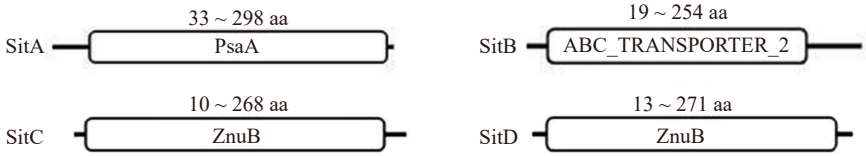
酸，具有 1 个 ABC_TRANSPORTER_2 特征结构域；*Lqp*13115 和 *Lqp*13110 基因的 ORF 长度分别为 858 和 852 bp，分别编码 285 和 283 个氨基酸，二者均含有 ZnuB 型金属结合结构域（图 1）。基于 NCBI 数据库的序列同源性分析表明，Lqp13125、Lqp13120 和 Lqp13115 氨基酸序列与 *Enterobacter roggenkampii* 中的铁转运蛋白 SitA、SitB 和 SitC 显示出高度相似性（identity > 90%）。同时，Lqp13110 与肠杆菌科（Enterobacteriaceae）来源的 SitD 同源蛋白序列一致性最高，为 95.73%。根据以上分析结果，本研究将 Lqp13125、Lqp13120、Lqp13115 和 Lqp13110 分别命名为 SitA、SitB、SitC 和 SitD。

2.2　SitABCD 系统各组分缺失、互补及过表达菌株构建

以 N-5-1 基因组 DNA 为模板，通过 PCR 扩增 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 基因扩增缺失突变体所需片段，经测序验证后，用 *Bam*HI/*Xho*I 或 *Not*I/*Sma*I 双酶切连接至 pWM91 载体。成功构建了 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 基因的缺失载体。随后，采用双亲结合法筛选缺失突变体，最终获得 Δ*sitA*、Δ*sitB*、Δ*sitC* 和 Δ*sitD* 缺失突变体，其鉴定结果见图 2A ~ D。

为构建互补菌株，首先扩增包含自身启动子区的 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 基因全长序列，并分别克隆到 pBBR1MCS2 载体，得到相应互补载体。将各载体转化至相应突变体感受态细胞中，获得补菌株 Δ*sitA-sitA*、Δ*sitB-sitB*、Δ*sitC-sitC* 和 Δ*sitD-sitD*。为排除载体自身影响，同时构建了空载体对照菌株 Δ*sitA-BV*、Δ*sitB-BV*、Δ*sitC-BV* 和 Δ*sitD-BV*。通过菌落 PCR 对互补菌株进行验证，分别使用 MCS1/2 引物和 *L. populi* N-5-1 内参基因引物 InfB238/579 进行扩增，产物大小均符合预期（图 2E ~ F）。表明互补菌株均成功构建。

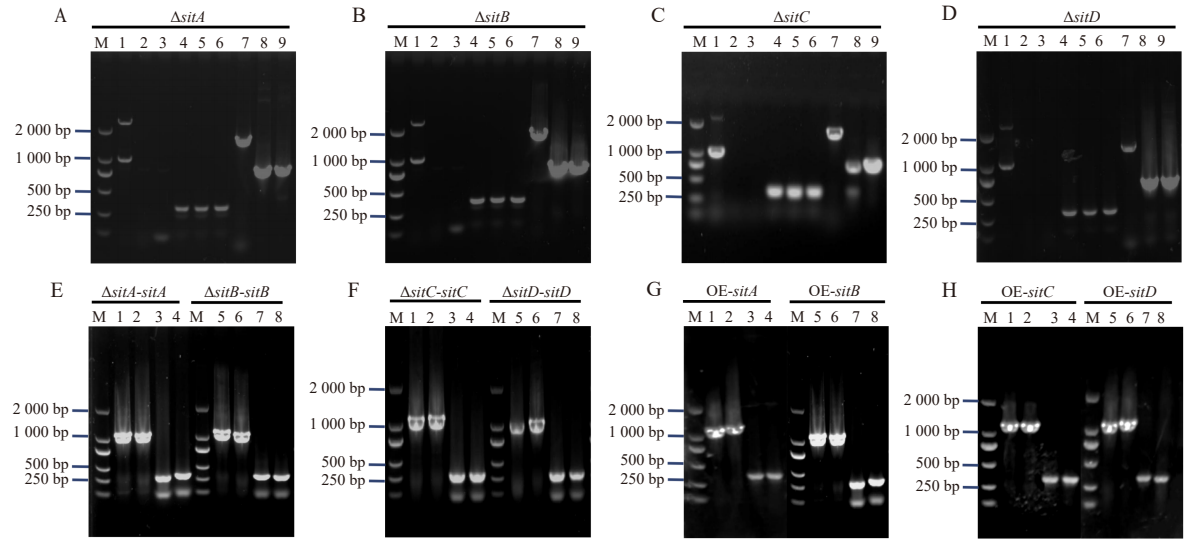
过表达菌株的验证同样采用 MCS1/2 和 InfB238/5794 两对引物进行 PCR。扩增条带大小与预期一致（图 2G ~ H）。为确认 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 的表达水平，通过 RT-qPCR 分析野生型与过表达菌株的基因表达差异。结果显示，与野生型相比，OE-*sitA*、OE-*sitB*、OE-*sitC* 和 OE-*sitD* 菌株中，相应靶基因的表达量均显著上调（$P < 0.001$）（图 3），证实过表达菌株构建成功。



黑色横线代表氨基酸序列大小，长方形代表不同类型结构域。

图 1　SitA、SitB、SitC 和 SitD 结构域分析

Fig. 1　Domain analysis of SitA, SitB, SitC and SitD



M: D2000 Plus DNA Marker；A~D. *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 缺失突变体的验证：泳道 1（WT）和泳道 2~3（突变体）：使用引物 Sacb1/2 扩增；泳道 4（WT）和泳道 5~6（突变体）：使用引物 InfB238/579 扩增；泳道 7（WT）和泳道 8~9（突变体）：分别使用基因特异性引物（*sitA*-1F/2R、*sitB*-1F/2R、*sitC*-1F/2R、*sitD*-1F/2R）扩增。E~F. *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 互补菌株的验证：泳道 1~2 和 5~6：使用引物 MCS1/2 扩增；泳道 3~4 和 7~8：使用引物 InfB238/579 扩增。G~H. *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 过表达菌株的验证：泳道 1~2 和 5~6：使用引物 MCS1/2 扩增；泳道 3~4 和 7~8：使用引物 InfB238/579 扩增。

图 2　缺失突变体、互补及过表达菌株的 PCR 验证

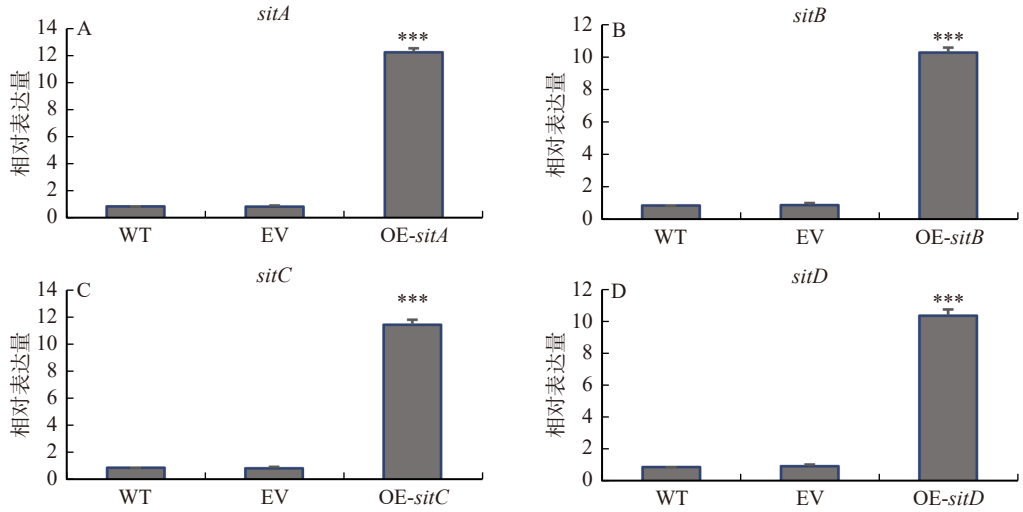
Fig. 2　PCR verification of deletion mutants, complementary strains and overexpression strains

2.3 SitABCD 系统各组分过表达减弱致病性

用细菌悬浮液(OD_{600} = 0.4)接种 2 年生的欧美杨枝条，接种后 9 d 测量病斑面积。结果显示，Δ*sitA*、Δ*sitB*、Δ*sitC* 和 Δ*sitD* 突变体产生的症状与野生型菌株相似，但在野生型背景下,利用 pBBR1MCS2 载体过表达 *sitA*、*sitB*、*sitC* 或 *sitD* 任一基因，均导致菌株致病力显著减弱(图 4A ~ B)。上述结果表明，SitABCD 系统并非病原菌致病所必需，但其表达水平的精细调控对于欧美杨细菌性溃疡病菌的致病性至关重要。

2.4 SitABCD 系统各组分过表达抑制锰−铁限制下的生长

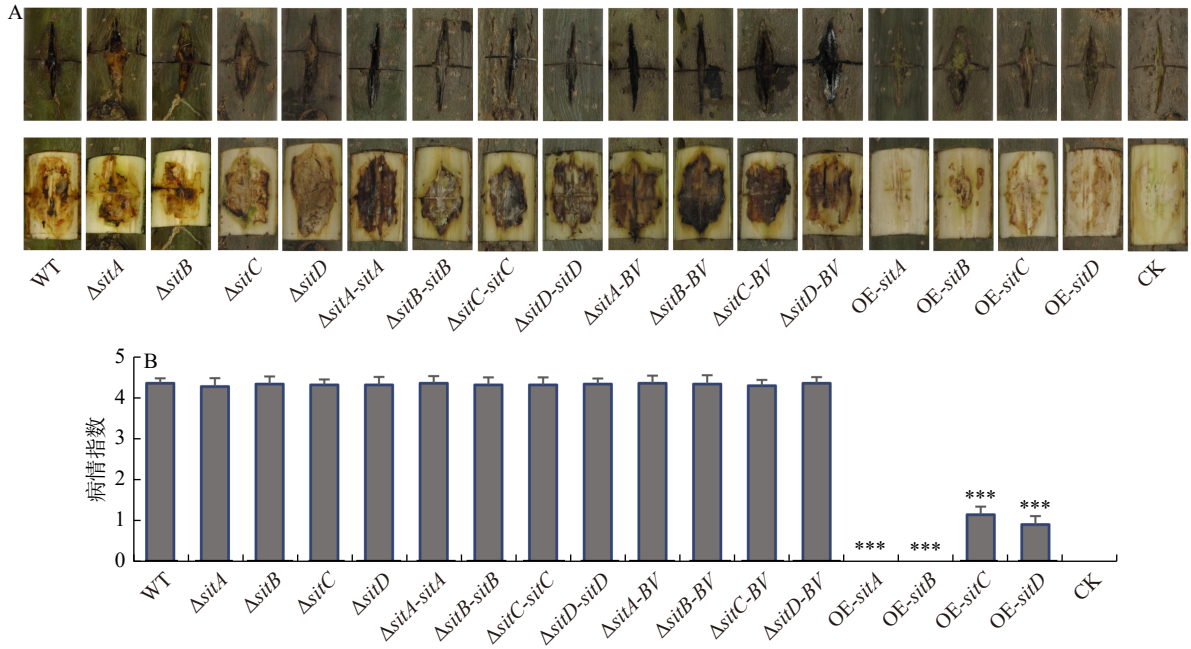
为探究 SitABCD 转运系统参与锰−铁利用的机制，比较了 N-5-1、各缺失突变体(Δ*sitA*、Δ*sitB*、Δ*sitC*、Δ*sitD*)、相应互补菌株(Δ*sitA*-*sitA*、Δ*sitB*-*sitB*、Δ*sitC*-*sitC*、Δ*sitD*-*sitD*)及过表达菌株(OE-*sitA*、OE-*sitB*、OE-*sitC*、OE-*sitD*)在不同培养条件下的生长特性。结果显示，所有菌株在 LB 培养基中生长无显著差异(图 5A)。在金属离子限制条件下，在仅含 30 μmol/L $MnSO_4$ 或 30 μmol/L $FeSO_4$ 的 M9 基础培养基进行



A ~ D. *sitA*、*sitB*、*sitC*、*sitD* 基因在野生型（WT）、空载体对照（EV）及相应过表达菌株（OE）中的表达水平。***表示在 $P < 0.001$ 水平上差异显著。下同。

图 3 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 过表达菌株的 RT-qPCR 检测

Fig. 3 RT-qPCR detection of *sitA*, *sitB*, *sitC*, and *sitD* overexpression strains



A. 上图表示杨树枝条的病害症状；下图显示剥去树皮后杨树木质部的损伤情况，在接种后 9 d 拍摄。B. 根据发病程度统计的病情指数。

图 4 缺失突变体、互补及过表达菌株的致病性

Fig. 4 Pathogenicity of deletion mutants, complementary strains and overexpression strains

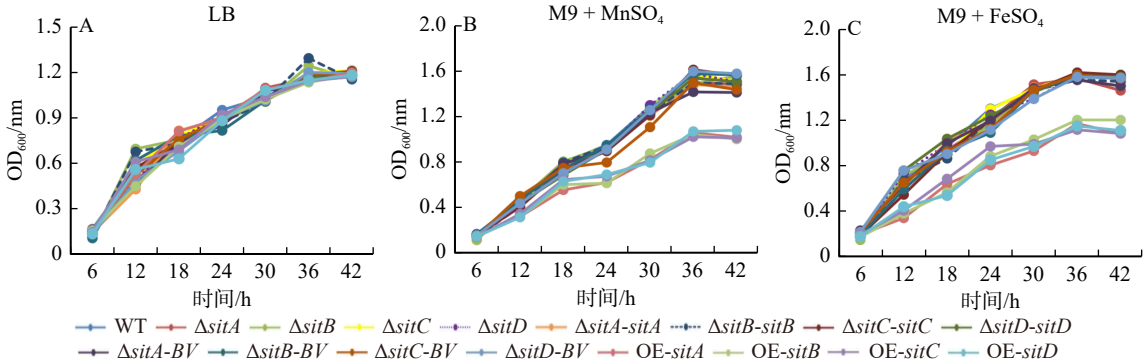
分析发现:*sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 的过表达菌株在 Mn 或 Fe 单独存在时,均表现出明显的生长抑制,而各缺失突变体与野生型的生长无显著差异(图 5B ~ C)。这些结果表明,SitABCD 转运系统的过度表达会显著影响细菌在铁−锰限制环境中的生长,说明该系统在极端条件下,维持金属离子稳态中起关键作用。

2.5　SitABCD 系统各组分缺失与过表达不影响游动性

为了研究 SitABCD 系统组分基因对细菌游动性的影响,比较了 N-5-1 及 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 基因的突变体、相应互补菌株及过表达株在半固体 LB 培养基平板上的游动能力。结果显示,与野生型菌株相比,*sitA*、*sitB*、*sitC* 或 *sitD* 任一基因的缺失或过表达均未显著改变菌株的游动能力(图 6A ~ B)。

2.6　SitABCD 系统各组分过表达抑制生物膜形成

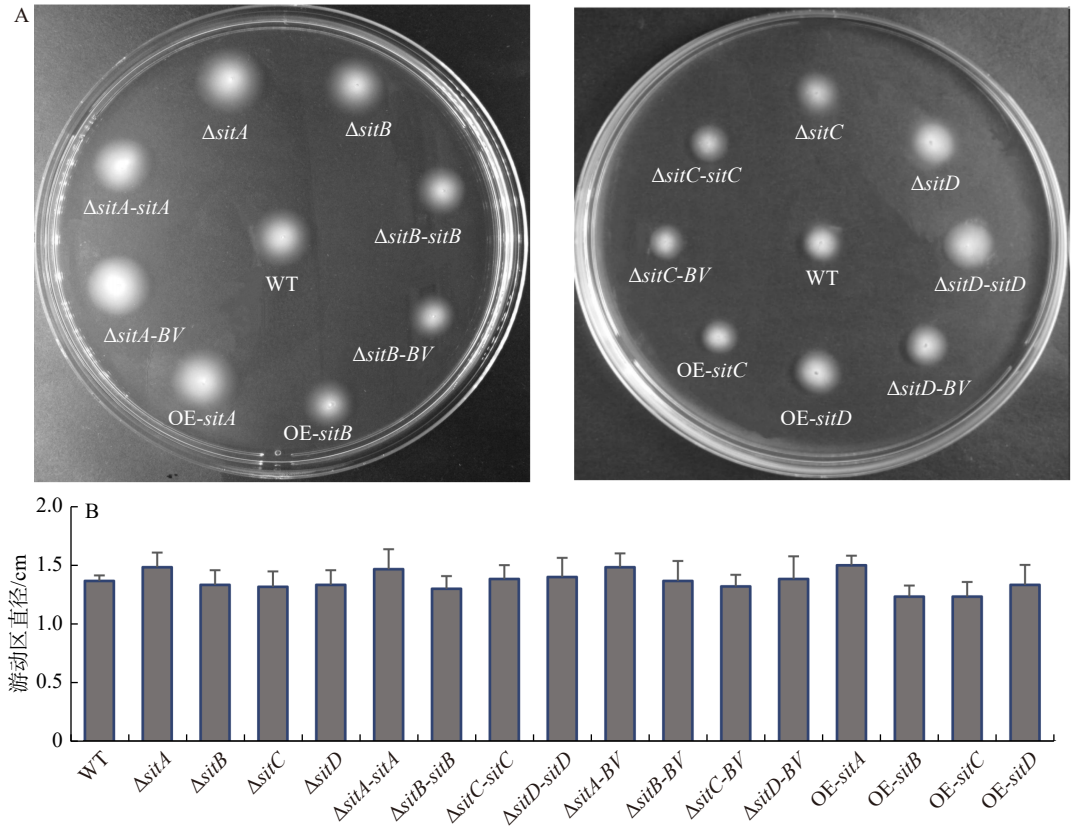
生物膜形成能力是决定细菌在植物体内定殖及症状扩展的关键因子。为探究 SitABCD 系统在生物膜形成中的作用,本研究采用结晶紫染色法比较了 N-5-1、突变体、相应互补菌株及过表达菌株的生物膜形成能力。结果显示,与野生型菌株相比,过表达菌株 OE-*sitA*、OE-*sitB*、OE-*sitC* 和 OE-*sitD* 的生物膜



A. *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 缺失突变体,相应基因互补菌株以及过表达菌株在LB培养基中的生长曲线;B. 各菌株在含 30 μmol/L $MnSO_4$ 的 M9 培养基中的生长曲线;C. 各菌株在含 30 μmol/L $FeSO_4$ 的 M9 培养基中的生长曲线,每隔 6 h 记录 1 次菌株生长。

图 5　缺失突变体、互补及过表达菌株的生长曲线

Fig. 5　Growth curves of deletion mutants, complementary strains, and overexpression strains



A. 各菌株在 0.3% LB 琼脂培养基中培养 48 h;B. 各菌株游动区直径。

图 6　缺失突变体、互补及过表达菌株的游动性

Fig. 6　Motility of deletion mutants, complementary strains and overexpression strains

形成能力显著降低。而突变体菌株 Δ*sitA*、Δ*sitB*、Δ*sitC* 和 Δ*sitD* 的生物膜形成能力与野生型相比，无显著差异(图 7)。以上结果表明，*sitA*、*sitB*、*sitC* 或 *sitD* 任一基因的过表达均显著抑制生物膜形成，而基因缺失均无显著影响，提示该系统可能以剂量依赖的方式调控生物膜形成。

2.7 SitABCD 系统各组分过表达增强氧化胁迫敏感性

生物被膜状态下的细菌通常表现出更强的环境适应性和耐药性。前期结果显示，过表达任一 *sit* 基因(*sitA*、*sitB*、*sitC*、*sitD*)均显著抑制生物膜形成。为探究该系统是否也影响细菌的胁迫响应，通过抑菌圈实验系统评估了 N-5-1、缺失突变体(Δ*sitA*、Δ*sitB*、Δ*sitC*、Δ*sitD*)和过表达菌株(OE-*sitA*、OE-*sitB*、OE-*sitC*、OE-*sitD*)对 H_2O_2、大观霉素和氯霉素的敏感性。结果显示，在 5% H_2O_2 胁迫下，所有过表达菌株的抑菌圈均显著大于野生型，而缺失突变体的抑菌圈大小与野生型无显著差异(图 8A)。在大观霉素和氯霉素胁迫下，所有缺失突变体和过表达菌株的抑菌圈均与野生型相似(图 8B～C)。以上结果表明，*sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 基因的表达水平是影响氧化胁迫耐受性的关键因素，其中任一基因的过表达均会削弱细菌的抗氧化能力。

为探究其分子机制，通过 RT-qPCR 分析了任一 *sit* 基因过表达对细菌氧化应激防御基因表达的影响。在非胁迫条件下(N-Tr)，所有过表达菌株中，*sodA*(超氧化物歧化酶)、*ahpC*(烷基过氧化氢还原酶)和 *katA*(过氧化氢酶)的表达水平均显著低于野生型($P < 0.001$)。经 H_2O_2 胁迫处理后(Tr)，野生型菌株中 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 的表达量分别上调了 4.1、3.2 和 4.9 倍($P < 0.001$)；而过表达菌株的应激诱导能力显著降低，上述基因的表达上调幅度明显减弱($P < 0.001$)(图 9)。此外，空载体对照菌株的表达水平与野生型无显著差异($P > 0.05$)，排除了载体本身的影响。综合以上结果，任一 *sit* 基因的过表达均会降低氧化应激防御基因(*sodA*、*ahpC*、*katA*)的基础表达水平，并显著削弱细菌的氧化应激响应能力。

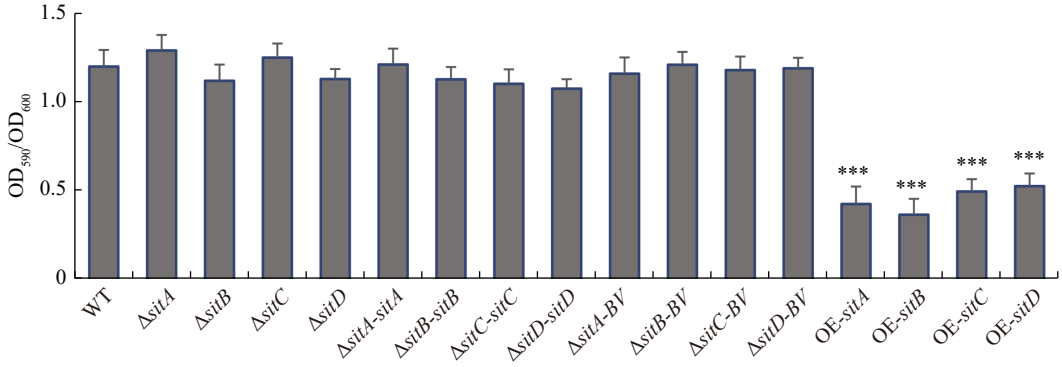
3 讨 论

本研究在欧美杨溃疡病菌 N-5-1 中鉴定出 Fe^{2+}-Mn^{2+}转运系统 SitABCD，并成功构建了该系统中 *sitA*、*sitB*、*sitC* 和 *sitD* 4 个基因的缺失突变体及相应过表达菌株。表型分析表明，尽管单基因缺失未引起显著表型变化，但任一基因的过表达均导致病原菌致病性显著下降，并伴随生物膜形成能力和氧化应激耐受性的降低。这些结果共同表明，SitABCD 系统中，各组分基因的表达水平需精确调控，其功能失衡是影响欧美杨溃疡病菌致病性的关键因子。

SitABCD 系统属于 ABC 型转运蛋白家族，主要负责 Fe^{2+}和 Mn^{2+}的高亲和力摄取[23]。然而，在本研究中，SitABCD 系统各组分的缺失突变体并未表现出明显的表型缺陷。基于基因组注释[22]，*L. populi* 基因组中，还编码其他推定的金属离子转运系统，如 MntABC 和 FeoAB。鉴于细菌金属转运系统普遍存在的功能冗余性，推断它们可能通过功能冗余补偿 SitABCD 任一组分缺失的影响，这为各缺失突变体未出现显著表型变化提供了合理解释。

核心发现是，*sitA*、*sitB*、*sitC* 或 *sitD* 中任一基因的过表达均导致毒力显著降低，表明该系统的表达水平需严格调控，过量表达可能超出细胞内稳态维持能力，从而引发毒性效应。基于此，提出如下核心假说：SitABCD 任一组分的过表达会破坏细胞内铁–锰离子稳态，导致其异常积累。一方面，通过 Fenton 反应促进羟基自由基生成，引起氧化损伤[24]；另一方面，离子稳态失衡可能通过扰乱全局金属调控网络，间接导致抗氧化基因表达下调与生物膜形成受阻，最终协同削弱病原菌在宿主环境中的适应性与致病性。

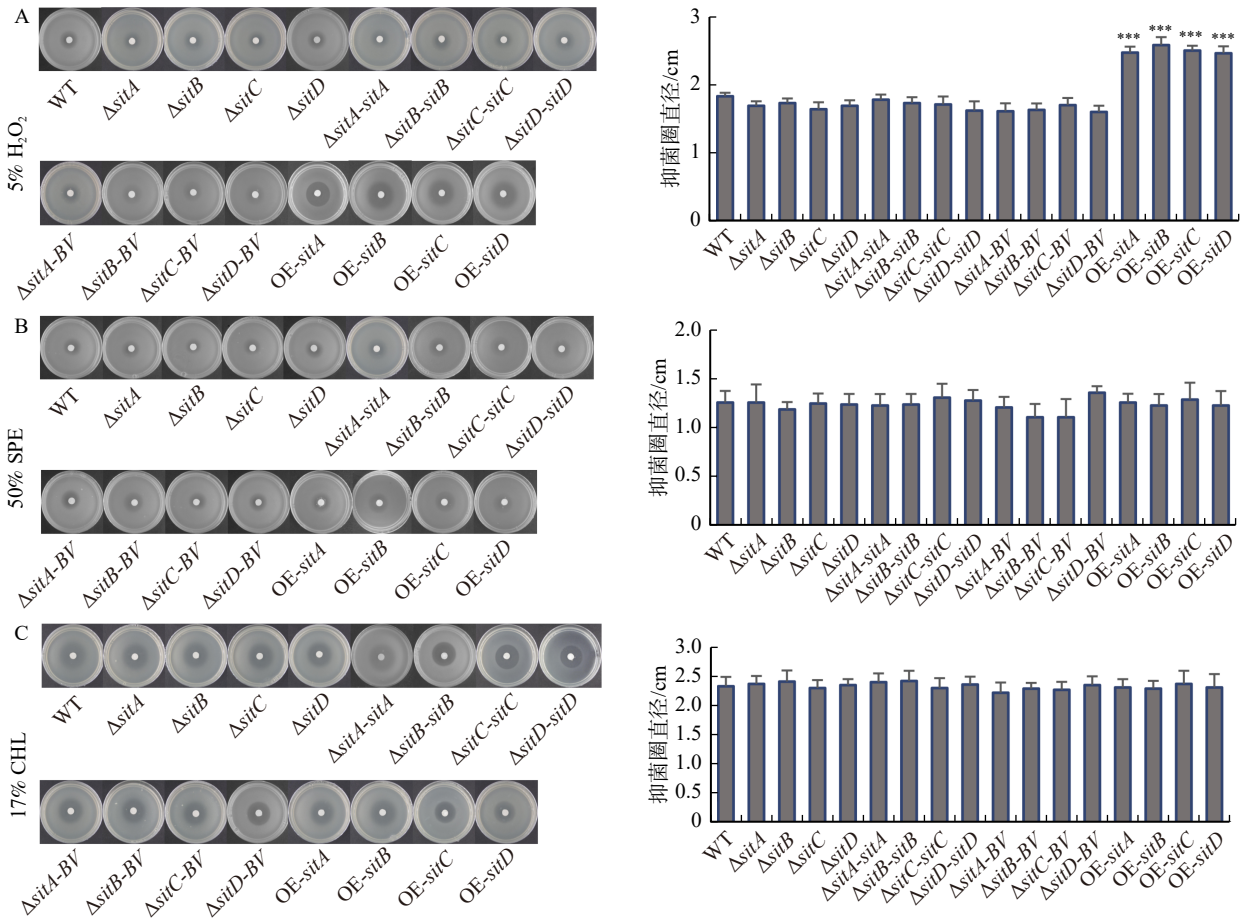
在铁–锰限制条件下，SitABCD 系统各组分的缺



生物膜形成能力通过光密度比值（OD_{590}/OD_{600}）进行量化。

图 7 缺失突变体、互补及过表达菌株的生物膜形成

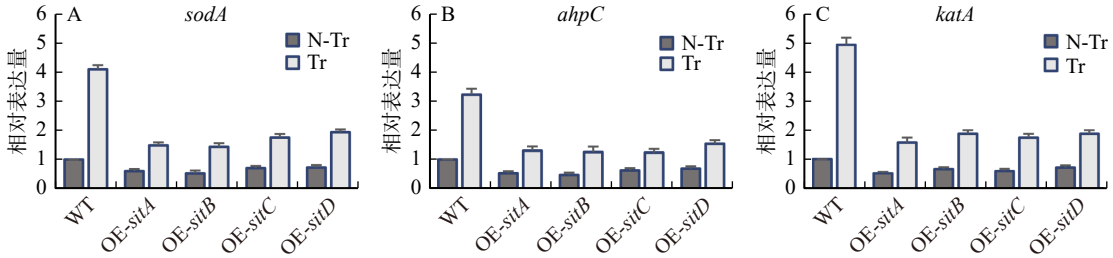
Fig. 7 Biofilm formation of deletion mutants, complementary strains and overexpression strains



将各菌株分别接种于 LB 固体培养基后制成平板，在平板中央的滤纸片上，分别进行如下处理：A. 加入 5 μL 5% H_2O_2；B. 滴加 1 μL 25% 大观霉素；C. 加入 3 μL 17%氯霉素。将平板置于30 ℃条件下培养 24 ~ 48 h 后，测定抑菌圈直径。

图 8　缺失突变体、互补及过表达菌株对 H_2O_2 与抗生素的敏感性

Fig. 8　Sensitivity of deletion mutants, complementary and overexpression strains to H_2O_2 and antibiotics



N-5-1 和过表达菌株中 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 基因在 5% H_2O_2 处理（Tr）和未处理（N-Tr）条件下的相对表达量。以 16S rRNA 作为内参基因，实验独立重复 3 次，每组设置 5 个生物学重复（$n = 5$）。

图 9　RT-qPCR 检测 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 基因的表达水平

Fig. 9　Detecting expression levels of *sodA*, *ahpC* and *katA* genes by RT-qPCR

失突变体生长均未受影响，但其过表达菌株均表现出明显的生长抑制。这一结果证实，当 SitABCD 系统中任一组分缺失时，*L. populi* 仍能维持正常的金属离子稳态和生长；相反，任一组分的过表达则可能打破离子平衡，导致胞内铁–锰离子异常积累并引发毒性效应，从而抑制生长。此外，与野生型相比，所有缺失突变体和过表达菌株的游动性均无显著差异。这表明，SitABCD 系统的功能失衡并未影响细菌的游动能力，从而将观察到的致病性缺陷更准确地归因于金属离子稳态失衡这一机制。

生物膜在增强细菌环境适应性、抵抗不利条件及抗生素防御中具有关键作用[25]。铁（Fe）和锰（Mn）作为生物膜基质合成与结构稳定所必需的微量元素，对此过程至关重要[26–27]。研究表明，金属离子的获取与生物膜形成之间存在相互依存的调控关系[28]。本研究中，SitABCD 各组分过表达菌株均表现出生物膜形成显著降低，这为上述假说提供了支持，金属离子过量积累可破坏生物膜形成。基于此推测，过

量 Fe^{2+}可能通过 Fenton 反应诱发氧化应激，导致生物膜基质损伤[24]；另一方面，离子失衡也可能通过干扰胞外多糖合成酶的功能或其所需的金属辅因子环境，从而抑制生物膜的正常形成。

氧化应激是病原菌在宿主体内必须克服的关键环境压力。宿主免疫系统通过产生活性氧（ROS）以清除病原菌[29]，而病原菌则依赖于以铁、锰为辅因子的抗氧化酶系统来维持胞内氧化还原稳态。研究表明，SitABCD 系统参与细菌的氧化应激响应。如禽致病性大肠杆菌中，SitABCD 协同其他离子转运系统摄取铁和锰，增强细菌的氧化应激耐受性[23]；苜蓿中华根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）中，*sitA* 基因缺失则导致其对过氧化氢敏感性升高[30]。然而在本研究中，SitABCD 系统任一组分缺失并未显著影响其氧化应激耐受性，再次印证了冗余转运系统可能提供功能补偿。值得注意的是，SitABCD 各组分过表达菌株对 H_2O_2 的敏感性显著增强，且抗氧化相关基因 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 转录水平均显著下调。这些发现与上述核心假说相符：SitABCD 系统任一组分的过表达引起细胞内 Fe^{2+}异常积累，一方面通过 Fenton 反应加剧氧化损伤[24]；另一方面，金属离子超载可能间接干扰相关金属感应调控蛋白（如 Fur 或 MntR 家族同源物的功能，从而抑制 *sodA*、*ahpC* 和 *katA* 等关键抗氧化基因的转录。已知在沙门氏菌中，Fur 和 MntR 通过直接抑制 SitABCD 操纵子的转录来预防金属过载[31]，这是一种保守的负反馈调节机制。本研究结果提示，在 *L. populi* 中，SitABCD 中任一组分的过表达可能破坏了这一调控途径，导致金属离子稳态失衡。过量积累的金属离子可能致使感应蛋白功能失调，从而抑制下游抗氧化基因的表达，最终削弱病原菌的抗氧化防御能力。

综上所述，SitABCD 中任一组分的过表达均会引发 Fe^{2+}-Mn^{2+}摄取异常增多，导致细胞内金属离子稳态失衡。一方面通过 Fenton 反应加剧氧化损伤；另一方面，通过反馈抑制抗氧化基因表达及生物膜形成相关通路，最终协同削弱病原菌在宿主环境中的适应性与致病力。未来研究可进一步深入解析 SitABCD 的表达调控机制及其与其他转运系统的互作关系；并探索基于铁–锰螯合剂或纳米载体等靶向干预策略，特异性干扰病原菌的金属离子稳态，为病害防控提供新的理论依据和潜在靶点。

4 结　　论

本研究解析了欧美杨溃疡病菌 Fe^{2+}-Mn^{2+}转运系统 SitABCD 的生物学功能。虽然缺失突变体未呈现明显的表型缺陷，但过表达 SitABCD 系统中，任一组分均能导致病原菌致病能力显著减弱，并显著抑制其在铁–锰限制条件下的生长速率、生物膜形成能力及抗氧化应激能力。本研究为阐明欧美杨细菌性溃疡病菌致病机制提供了新视角。

参 考 文 献

[1] Tóth T, Lakatos T, Koltay A. *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* isolated from bark canker of poplar trees [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(6): 2309−2313.

[2] Li Y, He W, Ren F, et al. A canker disease of *Populus* × *euramericana* in China caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* [J]. Plant Disease, 2014, 98(3): 368−378.

[3] 许兴华, 黄启伦, 李善文, 等. 美洲黑杨种质资源创制和综合评价 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(8): 79−86.
Xu X H, Huang Q L, Li S W, et al. Creation and comprehensive evaluation of *Populus deltoides* germplasm resources [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(8): 79−86.

[4] 康向阳. 关于我国林木育种向智能分子设计育种发展的思考 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(3): 1−7.
Kang X Y. Thoughts on the development of forest tree breeding towards intelligent molecular design breeding in China[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(3): 1−7.

[5] Stettler R F. Biology of *Populus* and its implications for management and conservation[M]. Ottawa: NRC Research Press, 1996.

[6] Jansson S, Douglas C J. *Populus*: a model system for plant biology [J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 435−458.

[7] 王海明, 牛迎福, 王永立, 等. 欧美杨细菌性溃疡病发生与危害林间观察 [J]. 中国森林病虫, 2015, 34(2): 19−22.
Wang H M, Niu Y F, Wang Y L, et al. Observation on the occurrence and damage of poplar bacterial canker in forest[J]. Forest Pest and Disease, 2015, 34(2): 19−22.

[8] 李永, 常聚普, 郭利民, 等. 欧美杨细菌性溃疡病菌的寄主范围调查及其寄主抗性物质的初步分析 [J]. 林业科学研究, 2021, 34(3): 56−63.
Li Y, Chang J P, Guo L M, et al. Investigation on host range of *Lonsdalea populi* and preliminary analysis of host resistance substances [J]. Forest Research, 2021, 34(3): 56−63.

[9] 张立春, 肖丹丹, 付田田, 等. 欧美杨细菌性溃疡病菌基因组测序与分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(2): 331−343.
Zhang L C, Xiao D D, Fu T T, et al. Whole-genome sequencing and analysis of *Lonsdalea populi* causing poplar canker [J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(2): 331−343.

[10] 杨莉, 张力群, 贺伟, 等. III型分泌系统是欧美杨溃疡病菌 *Lonsdalea quercina* 重要的致病因子 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(5): 512−520.
Yang L, Zhang L Q, He W, et al. Type III secretion system is an essential pathogenic factor in poplar canker pathogen *Lonsdalea quercina* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(5): 512−520.

[11] Hood M I, Skaar E P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface [J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(8): 525−537.

[12] Pandey A, Sonti R V. Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(12): 3187−3203.

[13] Janakiraman A, Slauch J M. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium* [J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(5): 1146−1155.

[14] Hood G, Ramachandran V, East A K, et al. Manganese transport is essential for N(2) -fixation by *Rhizobium leguminosarum* in bacteroids from galegoid but not phaseoloid nodules [J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(7): 2715−2726.

[15] Kitphati W, Ngok-Ngam P, Suwanmaneerat S, et al. Agrobacterium tumefaciens fur has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 4760−4768.

[16] Yang R L, Deng C Y, Wei J W, et al. A large-scale mutational analysis of two-component signaling systems of *Lonsdalea quercina* revealed that KdpD-KdpE regulates bacterial virulence against host poplar trees [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2018, 31(7): 724−736.

[17] Zheng Z, Deng C, He W, et al. The two-component system DcuS-DcuR is involved in virulence and stress tolerance in the poplar canker bacterium *Lonsdalea populi* [J]. Phytopathology, 2020, 110(11): 1763−1772.

[18] Yang R, Ming Z, Zeng S, et al. The two-component system CpxA/CpxR regulates pathogenesis and stress adaptability in the poplar canker bacterium *Lonsdalea populi* [J]. Molecular Plant Pathology, 2024, 25(11): e70029.

[19] 陈晓萌, 王悦辰, 柴栩婴, 等. 欧美杨细菌性溃疡病菌双组分基因缺失突变及其生物学表型分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 25−37.
Chen X M, Wang Y C, Chai X Y, et al. Deletion mutations and its phenotypic analysis of two-component genes in *Lonsdalea populi* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(9): 25−37.

[20] 李爱宁, 杨若兰, 魏强, 等. 欧美杨细菌性溃疡病菌双组份系统反应调节基因 *LqRR2* 的功能研究 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(4): 492−500.
Li A N, Yang R L, Wei Q, et al. Functional analysis of orphan *LqRR2* gene in *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(4): 492−500.

[21] 郑泽洋, 李爱宁, 常聚普, 等. 欧美杨细菌性溃疡病菌双组分系统 *lqp0812-lqp0813* 基因功能研究 [J]. 植物病理学报, 2020, 50(3): 301−310.
Zheng Z Y, Li A N, Chang J P, et al. Functional analysis of *lqp0812-lqp0813* genes of the two-component system from *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(3): 301−310.

[22] Chen X, Li R, Wang Y, et al. Genomic characterization provides an insight into the pathogenicity of the poplar canker bacterium *Lonsdalea populi* [J]. Genes, 2021, 12(2): 246−260.

[23] Sabri M, Léveillé S, Dozois C M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide [J]. Microbiology, 2006, 152(3): 745−758.

[24] Imlay J A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(7): 443−454.

[25] 傅本重. 植物与病原物互作中的生物膜研究 [J]. 植物保护, 2011, 37(1): 1−6.
Fu B Z. Biofilm formation in plant-microbe interactions [J]. Plant Protection, 2011, 37(1): 1−6.

[26] Zhang Y, Pan X, Wang L, et al. Iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the involved iron-targeted anti-biofilm strategies [J]. Journal of Drug Targeting, 2021, 29(3): 249−258.

[27] Horsburgh M J, Wharton S J, Karavolos M, et al. Manganese: elemental defence for a life with oxygen [J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(11): 496−501.

[28] Kang D, Kirienko N V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(7): 449−457.

[29] 武晓丽, 陈华民, 吴茂森, 等. 细菌鞭毛素对植物免疫防卫反应及其信号机制的激发 [J]. 植物保护, 2011, 37(3): 12−16.
Wu X L, Chen H M, Wu M S, et al. Flagellin signalling in plant defense responses [J]. Plant Protection, 2011, 37(3): 12−16.

[30] Chao T C, Becker A, Buhrmester J, et al. The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transporter [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(11): 3609−3620.

[31] Ikeda J S, Janakiraman A, Kehres D G, et al. Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by MntR and fur [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3): 912−922.

（责任编辑　范　娟　李　契
责任编委　张星耀）