

根癌农杆菌转录因子 PcaR 的功能分析

徐楠, 程爽, 王婉瑜, 李诚昊, 郭敏亮*

扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州

徐楠, 程爽, 王婉瑜, 李诚昊, 郭敏亮. 根癌农杆菌转录因子 PcaR 的功能分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5424-5437.

XU Nan, CHENG Shuang, WANG Wanyu, LI Chenghao, GUO Minliang. Functional analysis of transcription factor PcaR in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(12): 5424-5437.

摘要: 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)作为植物-微生物互作研究的经典模式生物, 是重要的植物转基因工具。植物受伤后分泌的酚酸类化合物会影响根癌农杆菌感染宿主。【目的】考察根癌农杆菌转录因子 PcaR 对简单酚酸类物质代谢的影响、对靶基因的调控作用, 以及对宿主植物致癌能力的影响。【方法】通过自杀质粒 pEX18Km 和带有强启动子的质粒 pUCA19 分别构建 *atu4546* 基因敲除株 *A. tumefaciens* Δ *atu4546* 和回补菌株 C- Δ *atu4546*。评估这些菌株在以原儿茶酸和对羟基苯甲酸为唯一碳源时的生长情况, 以及在胡萝卜茎块和落地生根叶片上的致癌能力。在野生型 C58 和 Δ *atu4546* 菌株中将报告基因原位插入到代谢靶基因 *atu4549* 下游, 通过检测 β -半乳糖苷酶活性研究 *atu4546* 对靶基因的调控关系; 通过构建含有 *atu4546* 自身启动子与 *lacZ* 报告基因的质粒研究 PcaR 的自调控特性。构建含有靶基因上游启动子区域与 *lacZ* 报告基因的质粒, 将生物信息学预测的结合位点去除和替换后, 通过测定 β -半乳糖苷酶活性确定 PcaR 结合位点。【结果】敲除 *atu4546* 基因不影响 *A. tumefaciens* 在蔗糖上的生长, 但导致 *A. tumefaciens* 无法利用对羟基苯甲酸和原儿茶酸作为唯一碳源, 回补 *atu4546* 后生长能力恢复。 Δ *atu4546* 菌株感染胡萝卜茎块和落地生根叶片后形成的肿瘤质量分别下降 34.90% 和 52.58%, 每 0.1 g 肿瘤中的菌落数分别减少 72.19% 和 80.54%。敲除 *atu4546* 基因使其自身启动子活性增强 102.04%, 说明 *atu4546* 负调控自身表达。 Δ *atu4546* 中靶基因下游的 β -半乳糖苷酶活性比野生型降低 74.86%, 表明 *atu4546* 促进 *atu4547-atu4549* 基因簇表达。通过 *atu4547* 启动子区序列改造实验确定 PcaR 结合位点为 GTGCGATATACGAAC。【结论】本研究表明转录因子 PcaR 参与酚酸分解代谢, 负调控自身并促进下游基因 *pcaIJF* 转录, 其对下游靶基因的结合位点为 GTGCGATATACGAAC。PcaR 的缺失会降低根癌农杆菌的致病性。本研究揭示了酚酸代谢-致病信号通路中的双重调控机制, 拓展了对微生物-植物互作的理论认知。

资助项目: 国家自然科学基金(22278350); 扬州大学高端人才支持计划

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22278350) and the High-end Talent Support Program of Yangzhou University.

*Corresponding author. E-mail: guoml@yzu.edu.cn

Received: 2025-05-12; Accepted: 2025-06-20; Published online: 2025-07-22

关键词: 根癌农杆菌; β -酮己二酸途径; PcaR

Functional analysis of transcription factor PcaR in *Agrobacterium tumefaciens*

XU Nan, CHENG Shuang, WANG Wanyu, LI Chenghao, GUO Minliang*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens*, a classic model organism for plant-microbe interaction research, is a valuable transgenic tool for plants. Phenolic acids secreted by plants after injury can affect the infection of the host by *A. tumefaciens*. **[Objective]** This study investigated the transcription factor PcaR of *A. tumefaciens* regarding its effects on the metabolism of simple phenolic acids, regulation of the target gene, and effect on the bacterial tumorigenicity in host plants. **[Methods]** The *A. tumefaciens* strain with *atu4546* knockout (Δ *atu4546*) and the complement strain C- Δ *atu4546* were constructed *via* the suicide plasmid pEX18Km and the plasmid pUCA19 with a strong promoter, respectively. Both Δ *atu4546* and C- Δ *atu4546* were tested for growth with *p*-hydroxybenzoic acid or protocatechuic acid as the sole carbon source and tumorigenicity on carrot stems and *Kalanchoe pinnata* leaves. In the wild-type strain C58 and Δ *atu4546*, the reporter gene was *in situ* inserted into the downstream region of the metabolic target gene *atu4549*. The regulatory link between *atu4546* and the target gene was examined based on the β -galactosidase activity. To investigate the self-regulation of PcaR, we constructed the *atu4546* self-promoter reporter plasmid. To identify the binding sites of PcaR, we constructed the upstream promoter region reporter plasmid of the target gene to remove or replace the predicted binding sites and then determined the β -galactosidase activity. **[Results]** The knockout of *atu4546* did not affect the growth of *A. tumefaciens* on sucrose, but led to the inability to use *p*-hydroxybenzoic acid or protocatechuic acid as the sole carbon source. The growth was restored after *atu4546* was complemented. The tumor weights of carrot stems and *K. pinnata* leaves infected by Δ *atu4546* decreased by 34.90% and 52.58%, respectively, and the number of colonies per 0.1 g tumor decreased by 72.19% and 80.54%, respectively. The knockout of *atu4546* led to a 102.04% increase in its own promoter activity, which suggested that *atu4546* negatively regulated its own expression. *Atu4546* boosted the expression of the *atu4547-atu4549* gene cluster, as evidenced by a 74.86% decrease in β -galactosidase activity downstream of the target gene in Δ *atu4546* compared with that in the wild type. The promoter region sequence alteration experiment identified GTGCGATATACGAAC as the binding site of PcaR. **[Conclusion]** This study shows that the transcription factor PcaR is involved in phenolic acid catabolism, negatively regulates itself and stimulates the transcription of the downstream gene *pcaIJF*. The binding site of PcaR to the target gene is GTGCGATATACGAAC. The knockout of PcaR attenuates the pathogenicity of *A. tumefaciens*. This study reveals the dual regulation mechanism in the phenolic acid metabolism-

pathogenic signaling pathway and expands the theoretical cognition of plant-microbe interactions.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; β -ketoadipate pathway; PcaR

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阴性菌,是引发植物冠瘿瘤病的主要病原菌^[1-3]。在自然环境中,它能够通过植物根部伤口入侵植物,将自身携带的 Ti 质粒上的 T-DNA 片段整合到植物基因组中,促使植物细胞异常增殖,进而形成肿瘤^[4]。这一过程主要依赖于细菌对植物信号分子的感知与响应,酚酸类化合物在其中扮演着关键角色^[5]。植物受伤后会释放出酚酸类物质,根癌农杆菌可借助趋化系统感知这些信号,向植物伤口部位聚集^[6]。酚酸类物质能够激活根癌农杆菌的 *vir* 基因,启动 T-DNA 的加工、转移和整合过程,从而实现植物的遗传转化^[7]。

β -酮己二酸途径是微生物降解芳香族化合物的重要代谢途径,广泛存在于土壤细菌和真菌中。此途径包含原儿茶酸途径和儿茶酚途径 2 个分支,涉及多个基因编码的多种酶的协同作用^[8]。该途径可将多种芳香族化合物,如阿魏酸、4-羟基苯甲酸等,逐步转化为 β -酮己二酸,最终进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle),为微生物的生长和生存提供能量与碳源^[9-10]。对 *A. tumefaciens* C58 基因组注释发现,其通过原儿茶酸途径代谢酚(酸)类化合物。原儿茶酸在 3,4-双加氧酶(*pcaHG*)的催化作用下,通过环氧键断裂机制发生开环反应生成 3-羧基顺式,顺式粘康酸酯;继而,3-羧基顺式,顺式粘康酸酯经顺式粘康酸环异构酶(*pcaB*)异构化作用进一步转化为 4-羧基粘康内酯,4-羧基粘康内酯在 4-羧基粘康内酯脱羧酶(*pcaC*)作用下发生脱羧反应,形成 β -酮己二酸烯醇内酯;随后, β -酮己二酸烯醇内酯水解酶(*pcaD*)催化 β -酮己二酸烯醇内酯水解,产生 β -酮己二酸^[10]。最终, β -酮己二酸经由 β -酮己二酸琥珀酰辅酶 A 转运酶(*pcaI*)和 β -酮己二酸单酰辅酶 A 硫解酶(*pcaF*)的级联催化反应,生成乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶

A^[11],进入三羧酸循环,为微生物提供能量代谢和物质合成所需的碳源及能量。目前,针对根癌农杆菌 β -酮己二酸途径的研究已取得一定进展。已明确编码该途径相关酶的基因主要分布在 *pcaDCHGB* 和 *pcaIJF* 2 个操纵子中,它们的转录受到不同调控因子的影响。*pcaDCHGB* 操纵子受 LysR 型调节蛋白 PcaQ 调控^[12-13]。此外,*pobA* 等基因也参与了酚酸类物质向原儿茶酸的转化过程,进而与 β -酮己二酸途径相联系^[14]。研究发现 PobR 作为一种转录激活因子不仅能够启动自身的负调控作用,还能激活下游靶基因 *pobA* 转录^[15]。除了转录因子 PcaQ 和 PobR, PcaR (*atu4546*)被注释为 IclR 家族转录因子,可能参与到根癌农杆菌 β -酮己二酸途径的调控。然而,其在根癌农杆菌中的具体功能以及与靶基因之间的调控关系尚未有研究。

本研究通过构建根癌农杆菌转录因子 PcaR (*Atu4546*)的基因敲除株及回补菌株,考察 *atu4546* 基因缺失对根癌农杆菌利用常用碳源和酚酸类碳源的影响。通过构建不同原位报告菌株和报告质粒探究 *atu4546* 基因对自身及下游靶基因的调控模式及具体结合位点。此外,通过在胡萝卜茎块和落地生根叶片上的致瘤实验考察 *atu4546* 基因对根癌农杆菌致病性的影响。本研究旨在揭示转录因子 PcaR 在根癌农杆菌代谢调控及致病过程中的功能,为深入解析根癌农杆菌的酚酸代谢与致病机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)野生型菌株为基因组测序用菌株 C58,其 Ti 质粒为胭脂碱型。根癌农杆菌的 *pcaR* 缺失菌株 Δ *atu4546* 是由 C58 敲除该蛋白质的编码基因所得,缺失突变体采用全编码框无痕删除法获得^[16]。大肠杆菌

(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株用作构建质粒的宿主菌。大肠杆菌用 LB 培养基培养。根癌农杆菌用富营养培养基 MG/L (mannitol-glutamate/lysogeny broth) 或全合成培养基 AB (*Agrobacterium minimal medium*)-蔗糖培养基培养, 具体配方见参考文献[17-18]。本研究所用的质粒见表 1。

1.2 根癌农杆菌 *atu4546* 缺失株及回补株的获得

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取 C58 菌株基因组 DNA。以 C58 菌株基因组为模板, 分别使用引物对 *Atu4546-U-F/Atu4546-U-R* 和 *Atu4546-D-F/Atu4546-D-R* 扩增 *atu4546* 上、下游同源臂。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times Hieff Canace[®] Plus PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, C58 基因组 1 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。将自杀质粒 pEX18Km 用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切获得线性载体, 分别与 *atu4546* 上、下游同源臂以同源重组的方式连接。连接体系: 线性化载体 2 μ L,

上、下游片段各 1 μ L, 2 \times CE Mix 5 μ L, ddH₂O 补至 10 μ L。连接产物经热激转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 待菌落在卡那霉素抗性平板上长出后, 用引物对 *Atu4546-U-F/Atu4546-D-R* 进行菌落 PCR 验证。PCR 反应体系 (20 μ L): 2 \times Rapid Taq Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 以单菌落为模板, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。经菌落 PCR 鉴定后送往北京擎科生物科技股份有限公司测序, 序列正确的质粒为 pEX18Km-*atu4546*。向根癌农杆菌 C58 感受态中加入测序成功的质粒 10 μ L, 用枪头吹吸混匀, 冰上放置 8 min。将混匀液加入到电转杯中, 设置电转仪(Eppendorf 公司)参数为 1 200 V/mm, 连续按 start 键 3 下, 结束后快速取出电转杯, 向其中加入 1 mL 预冷 MG/L 液体培养基, 吹吸混匀, 将混匀液吸至 1.5 mL 离心管中, 将离心管放置在 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 缓慢复苏 2 h, 复苏完成后 4 500 r/min 离心 3 min, 弃部分上清, 重悬沉淀, 将菌液涂布在含卡那霉素抗性(100 μ g/mL)的 MG/L 平板上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 36 h。经过卡那霉素抗性 (100 μ g/mL)和蔗糖敏感性(5% 蔗糖)正向和反向

表1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Purpose and properties	Source
pEX18Km	Suicide plasmid for knockout, carrying reverse selection markers <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , and <i>Km^R</i>	[19]
pEX18Km- <i>atu4546</i>	The <i>atu4546</i> knockout box is inserted into pEX18Km for knockout of <i>atu4546</i>	This study
pCB301	Promoter less expression plasmid, <i>Km^R</i>	[19]
pCB301-Prm4546- <i>lacZ</i>	The upstream promoter of <i>atu4546</i> was linked to the reporter gene <i>lacZ</i> and integrated into pCB301	This study
pCB301-Prm4547- <i>lacZ</i>	The upstream promoter of <i>atu4547</i> was linked to the reporter gene <i>lacZ</i> and integrated into pCB301	This study
pCB301-Prm4547 (remove the binding site)- <i>lacZ</i>	pCB301-Prm4547- <i>lacZ</i> removes transcription factor binding sites	This study
pCB301-Prm4547 (unrelated sequence)- <i>lacZ</i>	The transcription factor binding site on pCB301-Prm4547- <i>lacZ</i> was replaced by an unrelated sequence	This study
pUCA19	For the construction of gene complement plasmid, carrying an agrobacterial replicon, <i>Ap^R</i> , <i>Cr^R</i>	[20]
pUCA19- <i>atu4546</i>	The coding region of <i>atu4546</i> was inserted into pUCA19 to express <i>atu4546</i>	This study

2次筛选,对转化子进行菌落PCR和DNA测序验证,得到 $atu4546$ 缺失突变体 $\Delta atu4546$ 。

获得 $atu4546$ 回补株时使用具有强启动子的pUCA19载体。使用引物对C- $atu4546$ -F/C- $atu4546$ -R以C58基因组为模板扩增 $atu4546$ 基因编码区。将pUCA19载体使用限制性内切酶Hind III和BamHI进行双酶切。将 $atu4546$ 编码区序列和线性化的pUCA19载体进行同源重组连接,连接产物经热激转化至大肠杆菌DH5 α 感受态中,经菌落PCR验证和测序结果正确的质粒命名为pUCA19- $atu4546$ 。将重组质粒pUCA19- $atu4546$ 通过电击转化方式^[18]转入 $\Delta atu4546$ 菌株感受态中,在含有羧苄霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抗性的MG/L平板上28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养36 h,将长出的单菌落进行纯化,随后进行菌落PCR鉴定,鉴定成功的菌落即为回补株*A. tumefaciens* C- $\Delta atu4546$ 。所用引物见表2。

1.3 含有 $lacZ$ 报告基因菌株的获得

1.3.1 Prm4546- $lacZ$ 菌株的获得

为了研究 $atu4546$ 对自身是否具有调控作用,首先使用引物对Prm4546-F/Prm4546-R和LacZ-F/LacZ-R分别以*A. tumefaciens* C58和大肠杆菌BL21为模板,扩增 $atu4546$ 基因上游启动子序列和 $lacZ$ 编码区,然后与无启动子的pCB301载体进行同源重组连接。将连接片段化转至大肠杆菌DH5 α 感受态中,待菌落PCR和测序结果均正确后获得重组质粒pCB301-Prm4546- $lacZ$ 。随后将重组质粒分别电击转化^[18]至野生型C58以及 $\Delta atu4546$ 菌株中,在含有羧苄霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抗性的MG/L平板上28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养36 h,将长出的单菌落进行纯化,随后进行菌落PCR鉴定。

1.3.2 $atu4549$ 原位插入 $lacZ$ 菌株的获得

为了研究 $atu4546$ 对下游基因 $pcalJF$ 的调控作用,在C58以及 $atu4546$ 突变菌株的 $atu4549$ 基因下游原位插入 $lacZ$ 报告基因,通过 β -半乳糖苷酶活性反映 $pcalJF$ 基因的表达水平。

设计3对引物,以野生型C58基因组为模板,用引物4549-502-F1、4549-502-R2扩增出 $atu4549$ 基因下游502 bp的片段,用4549 $lacZ3$ 、4549 $lacZ4$ 扩增含有同源臂的全长 $lacZ$ 基因,用4550-485-F5、4550-485-R6扩增 $atu4550$ 基因上游485 bp的片段。为了精确mRNA在核糖体上的定位,在 $lacZ$ 序列上游添加一段12 bp长的SD序列,该序列为5'-TTTCTCCTCTTT-3'。将上述3段序列进行扩增,随后将纯化的3个DNA片段与线性pEX18Km载体同源重组连接,接着热激转化至大肠杆菌DH5 α 感受态中,将菌落PCR鉴定正确的菌落送北京擎科生物股份有限公司测序,测序结果正确后提取质粒。然后将其电转入^[18]野生型C58以及 $\Delta atu4546$ 菌株中,经过多次筛选以及PCR鉴定获得C58-4549- $lacZ$ 与 $\Delta atu4546$ -4549- $lacZ$ 菌株。所用引物见表2,设计原理如图1所示。

1.3.3 Prm4547- $lacZ$ 以及去除和替换结合位点菌株的获得

为了确定 $atu4546$ 与下游基因 $atu4547$ 启动子区域的结合位点,获得了含有 $lacZ$ 报告基因的菌株,方法如下:首先使用引物Prm4547-F/-R和LacZ-F/-R分别扩增 $atu4547$ 的启动子序列和 $lacZ$ 基因序列,然后将纯化后的2个DNA片段与无启动子的线性pCB301质粒同源重组连接,经热激转化至大肠杆菌DH5 α 感受态中。将菌落PCR鉴定正确的菌落送北京擎科生物股份有限公司测序,测序结果正确后提取质粒pCB301-Prm4547- $lacZ$ 。然后将其电转入^[18]野生型C58以及 $\Delta atu4546$ 菌株中,获得C58-Prm4547- $lacZ$ 与 $\Delta atu4546$ -Prm4547- $lacZ$ 菌株。去除结合位点与结合位点替换为无关序列的菌株获得方法如下:首先利用MEME suite^[21]预测了 $atu4546$ 与 $atu4547$ 启动子区域的结合序列为GTGCGATATACGAAC,然后通过重叠PCR的方法将 $atu4547$ 启动子区域的结合序列去除或替换成无关序列。接着将其与 $lacZ$ 连接并克隆入无启动子的pCB301质粒中,获得重组质粒

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Purpose
<i>Atu4546-U-F</i>	GGCCAGTGCCAAAGCTTCGCAGTGTTTCGAAACGGGA	Amplify the upstream homologous arm of <i>atu4546</i>
<i>Atu4546-U-R</i>	TCGCACAAATGGAGCTTGAGCGCGGTGTCAACCCGCG	Amplify the upstream homologous arm of <i>atu4546</i>
<i>Atu4546-D-F</i>	CGCGTTGACACCCCGCTCAAGCTCCATTTGTGCGA	Amplify the downstream homologous arm of <i>atu4546</i>
<i>Atu4546-D-R</i>	CGGTACCCCGGGATCCGTGTAGAAAGCGGGAATGCCA	Amplify the downstream homologous arm of <i>atu4546</i>
<i>C-atu4546-F</i>	TGATTACGCCAAGCTTATGGCTGTCAGTGAAAGAGACATGA	Amplify <i>atu4546</i>
<i>C-atu4546-R</i>	CGGTACCCCGGGATCCCTCAGACCAGCAFTTCTCGCCAG	Amplify <i>atu4546</i>
<i>Prm4546-F</i>	TAGAACTAGTGGATCCTCTCAAAAACCTCCATCCAGC	Amplify the promoter region of <i>atu4546</i>
<i>Prm4546-R</i>	AAATGGAGCTTGAGCATGACCATGATTACG	Amplify the promoter region of <i>atu4546</i>
<i>4549-502-F1</i>	GCCAGTGCCAAAGCTTGAAGCTGAAGCCGGTCAAC	Amplify the downstream homologous arm of <i>atu4549</i>
<i>4549-502-R2</i>	GTGAATCCGTAATCATGGTCAATTTCTCTCTTTTCAGACCCGCTCCAGCG	Amplify the downstream homologous arm of <i>atu4549</i>
<i>4549lacZ3</i>	CGCTGGAAGCGGCTGAAAAAGAGGAGAAATGACCATGATTACGGATTCCAC	Amplification of <i>lacZ</i> containing <i>atu4549</i> homologous arm
<i>4549lacZ4</i>	CGAATGCCGCTTTTCCCGTTATTTTTGACACCAGACCAACT	Amplification of <i>lacZ</i> containing <i>atu4549</i> homologous arm
<i>4550-485-F5</i>	AGTTGGTCTGGTCAAAAATAACGGGAAAAGCGGCATTCG	Amplify the upstream homologous arm of <i>atu4550</i>
<i>4550-485-R6</i>	GGTACCCGGGATCCGGGGCTTTTGGGACATCT	Amplify the upstream homologous arm of <i>atu4550</i>
<i>Prm4547-F</i>	AGAACTAGTGGATCCGATGACCCGCAAAACCCCTT	Amplify the promoter region of <i>atu4547</i>
<i>Prm4547-R</i>	GTAATCATGGTCAATCTCAAAAACCTCCATCCAGC	Amplify the promoter region of <i>atu4547</i>
<i>LacZ-F</i>	ATGGAGGTTTTGAGAAATGACCCATGATTACGGATTCCAC	Amplify <i>lacZ</i>
<i>LacZ-R</i>	GGTATCGATAAGCTTTTATTTTTGACACCAGACCAACT	Amplify <i>lacZ</i>
<i>Prm4547-delete-1</i>	GATGACCCGCAAAACCCCTTGG	Amplify the upstream sequence of the binding site
<i>Prm4547-delete-2</i>	GTGCGTTATATGATTTTAAATGGAGCTTGAGCATGG	Amplify the upstream sequence of the binding site
<i>Prm4547-delete-3</i>	CCATGCTCAAGCTCCATTTAAAAATCATATAACGCACAAAATCC	Amplify the downstream sequence of the binding site
<i>Prm4547-delete-4</i>	TCTCAAAAACCTCCATCCAGC	Amplify the downstream sequence of the binding site
<i>Prm4547-unrelated-1</i>	GATGACCCGCAAAACCCCTTGG	Amplifying upstream fragment of unrelated sequence
<i>Prm4547-unrelated-2</i>	TTAATGGCAACTTTTAAATGGAGCTTGAGCATGG	Amplifying upstream fragment of unrelated sequence
<i>Prm4547-unrelated-3</i>	AAAAGTTGCCATTAATAAAAATCATATAACGCACAAAATCC	Amplify the downstream fragment of unrelated sequence
<i>Prm4547-unrelated-4</i>	TCTCAAAAACCTCCATCCAGC	Amplify the downstream fragment of unrelated sequence

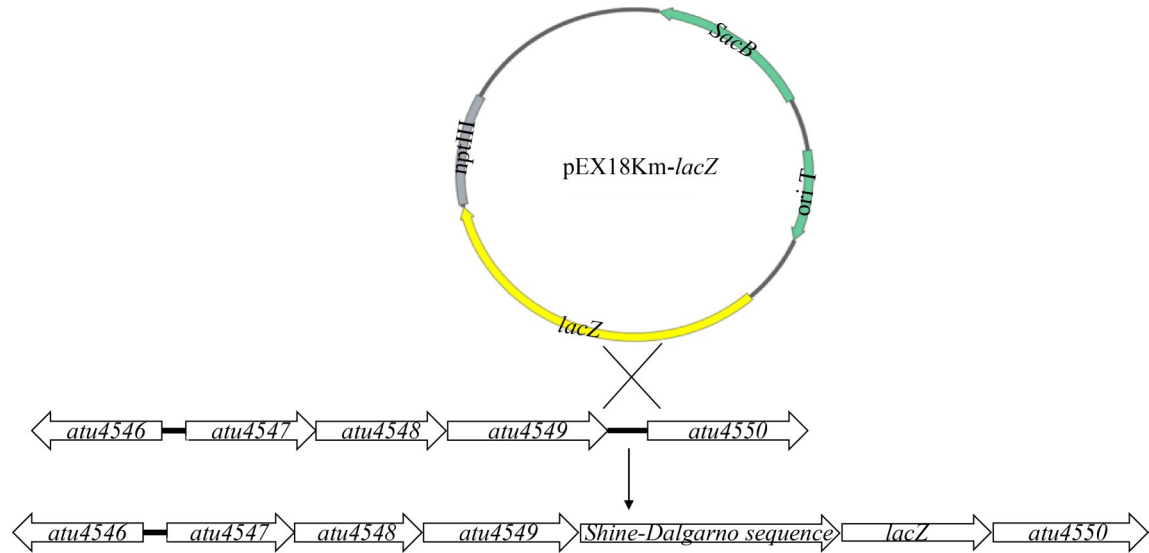


图1 *atu4549*下游原位插入*lacZ*示意图

Figure 1 The schematic diagram of *in situ* insertion of *lacZ* in the downstream of *atu4549*.

pCB301-Prm4547 (remove the binding site)-*lacZ* 与 pCB301-Prm4547 (unrelated sequence)-*lacZ*, 方法与 1.3.1 一致。所用引物见表 2。

1.4 以蔗糖为唯一碳源生长曲线的测定

将野生型 C58、 $\Delta atu4546$ 以及 C- $\Delta atu4546$ 这 3 种菌株在 MG/L 平板上进行三区划线, 28 °C 倒置培养 36 h。接着用接种环挑取单菌落于 5 mL MG/L 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养约 14 h, 然后 4 500 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用无菌水清洗菌体 2-3 次。接着将菌液 OD_{600} 调至 1.0, 取 1 mL 菌液转接到 100 mL 对应的 AB-蔗糖培养基中, 28 °C、200 r/min 培养约 60 h。培养期间每 4 h 取 1 次样, 测量 OD_{600} 数值, 直至到达衰退期。

1.5 以对羟基苯甲酸或原儿茶酸为碳源生长曲线测定

按照 1.4 节的方法培养菌株, 4 500 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 AB-无碳源合成培养基清洗菌体 2-3 次后, 将菌液 OD_{600} 调成 1.0。分别取 1 mL 菌液接种到新鲜的 100 mL AB-对羟基苯甲酸(5 mmol/L)和 AB-原儿茶酸(10 mmol/L)合成培养基中。每种菌设置 3 个重复组。每隔 4 h 取样, 到达衰退期结束取样。

1.6 β -半乳糖苷酶活性测定

将 C58-Prm4546-*lacZ*、 $\Delta atu4546$ -Prm4546-*lacZ*、C58-4549-*lacZ*、 $\Delta atu4546$ -4549-*lacZ*、C58-Prm4547-*lacZ*、 $\Delta atu4546$ -Prm4547-*lacZ* 以及去除结合位点和替换成无关序列的菌株在含有相应抗性的 MG/L 平板上活化, 接着挑取单菌落于 MG/L 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 14 h, 然后 4 500 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 AB-阿拉伯糖培养基清洗菌体 2-3 次, 取 200 μ L 转接至 5 mL 对应的 AB 培养基中培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)。接着取出菌液, 测定相应 OD_{600} 数值, 取 200 μ L 菌液, 依次加入 900 μ L Z-buffer (已添加无水乙醇)、50 μ L 氯仿、20 μ L 0.1% 的 SDS, 旋涡振荡 30 s 后于 37 °C 水浴 15-30 min, 每组设置 3 个重复。最后加入 200 μ L 的 ONPG, 记录溶液变黄的时间。溶液变黄后立即加入终止反应剂 Na_2CO_3 , 4 500 r/min 离心 3 min 后将上清液吸出, 测量 OD_{420} 值。 β -半乳糖苷酶活性计算如公式(1)所示。

$$\beta\text{-半乳糖苷酶活} = \frac{1\,000 \times OD_{420}}{t(\text{min}) \times V(\text{mL}) \times OD_{600}} \quad (1)$$

式中: t 、 V 、 OD_{600} 、 OD_{420} 分别为反应时间、菌液体积和吸光度、反应后样品的 420 nm 下吸光度。

1.7 致瘤实验

为了探究 *atu4546* 对根癌农杆菌致病性的影响, 选择了胡萝卜和落地生根 2 种植物作为研究对象。将 C58、 Δ *atu4546* 及 C- Δ *atu4546* 菌株 28 °C、200 r/min 培养 14 h。然后转接至 AB-蔗糖培养基中继续培养至对数生长期 (OD_{600} =0.6–0.8), 使用无菌水清洗 2–3 次, 将每种菌液 OD_{600} 调至 0.5。接着清洗胡萝卜, 将胡萝卜、金属打孔器、手术刀在 1.05% 的次氯酸钠溶液中浸泡 30 min 杀菌。然后用金属打孔器和手术刀将胡萝卜切割为同样厚度 (约为 5 mm) 的柱状圆盘, 相隔 1.5 cm 间距放在 1.5% 的水琼脂平板上, 取 5 μ L 菌液接种于胡萝卜圆盘中央, 每组菌设置 15 个重复, 将平板于 28 °C 培养。落地生根叶片用 75% 的乙醇棉球擦拭干净, 使用针头在叶片上划相同长度的伤口, 取 5 μ L 菌液至伤口位置, 室温放置在阴凉处。在培养 4 周以后, 将胡萝卜茎块和落地生根叶片上的肿瘤取下称重。接着取 0.1 g 的肿瘤放入研钵中, 加入无菌生理盐水进行充分研磨。然后吸取 100 μ L 菌液稀释至 10^{-8} 后, 取 100 μ L 涂布到含蔗糖的 AB 平板, 28 °C 培养 48 h 后对平板上的菌落进行计数。

1.8 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 10.0 对所有数据进行处理和绘图, 采用 *t* 检验 (*t*-test) 进行统计学分析, 显著差异用 * 表示, ns: 差异不显著; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 根癌农杆菌 *atu4546* 对生长的影响

为研究 *atu4546* 的功能, 首先通过自杀质粒 pEX18Km 同源重组获得 *atu4546* 基因敲除株 *A. tumefaciens* Δ *atu4546*。然后, 利用质粒 pUCA19 在 Δ *atu4546* 菌株中表达 *atu4546* 得到回补菌株 C- Δ *atu4546*。以常见碳源(蔗糖)和酚酸(对羟基苯甲酸和原儿茶酸)为唯一碳源, 研究野生型菌株 C58、*atu4546* 敲除突变体 Δ *atu4546* 和回补菌株 C- Δ *atu4546* 的生长情况。如图 2A 所示, 3 种菌

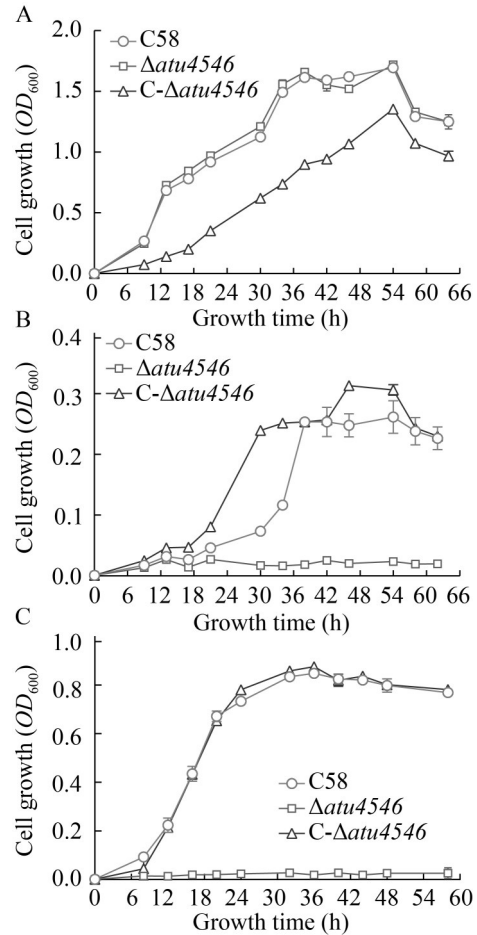


图2 根癌农杆菌在不同唯一碳源AB培养基上的生长情况。A: C58、 Δ *atu4546*及C- Δ *atu4546*菌株以 15 mmol/L蔗糖为唯一碳源的生长曲线; B: C58、 Δ *atu4546*及C- Δ *atu4546*菌株以5 mmol/L对羟基苯甲酸为唯一碳源的生长曲线; C: C58、 Δ *atu4546*及C- Δ *atu4546*菌株以10 mmol/L原儿茶酸为唯一碳源的生长曲线。

Figure 2 Cell growth of *Agrobacterium tumefaciens* strains on AB medium with different sole carbon sources. A: The growth curves of C58, Δ *atu4546*, and C- Δ *atu4546* strains using 15 mmol/L sucrose as the sole carbon source; B: The growth curves of C58, Δ *atu4546*, and C- Δ *atu4546* strains using 5 mmol/L *p*-hydroxybenzoic acid as the sole carbon source; C: The growth curves of C58, Δ *atu4546*, and C- Δ *atu4546* strains with 10 mmol/L protocatechuic acid as the sole carbon source.

株在常用碳源蔗糖上的生长趋势相似, 这表明 *atu4546* 对根癌农杆菌的中心碳代谢无影响。进一步考察根癌农杆菌在非常用碳源上的生长情况, 发现野生型 C58 能够利用对羟基苯甲酸和原儿茶酸作为唯一碳源生长。当 *atu4546* 被敲除后, C58 不能利用对羟基苯甲酸和原儿茶酸作为唯一碳源生长。相比之下, 在 $\Delta atu4546$ 中表达 *atu4546* 时其生长缺陷得以恢复(图 2B、2C)。这些结果表明 *atu4546* 参与对羟基苯甲酸和原儿茶酸的分解代谢。由于 *atu4546* 被注释为转录因子, 说明该基因参与根癌农杆菌 β -酮己二酸途径的代谢调控。

2.2 *atu4546* 对自身的调控作用

为探究 *atu4546* 对自身的调控作用, 首先将 *atu4546* 基因上游调控区与 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 连接, 并克隆入无启动子的 pCB301 质粒中, 获得重组质粒 pCB301-Prm4546-*lacZ*。然后将重组质粒分别转化入野生型 C58 和 $\Delta atu4546$ 菌株中, 通过测定 β -半乳糖苷酶活性探究 *atu4546* 对自身的调控作用。如图 3 所示, $\Delta atu4546$ 中 *atu4546* 启动子区控制下的 β -半乳糖苷酶活性比野生型 C58 高 102.04%, 在添加原儿茶酸和己二酸后, $\Delta atu4546$ 菌株中 β -半乳糖苷酶活性依然显著高于未敲除 *atu4546* 的野生型菌株, 结果表明 *atu4546* 对自身具有负调控作用。此外, 在 C58 中额外添加原儿茶酸或己二酸后 β -半乳糖苷酶活性较未添加时无显著性差异。

2.3 *atu4546* 对下游基因 *pcaIJF* 的调控作用

为探究 *atu4546* 对下游基因的调控作用, 将报告基因 *lacZ* 分别原位插入野生型 C58 和 $\Delta atu4546$ 中 *pcaF* (*atu4549*) 下游, 通过测量 β -半乳糖苷酶活性探究 *atu4546* 对下游基因 *pcaIJF* 的调控作用。如图 4 所示, $\Delta atu4546$ 中的 β -半乳糖苷酶活性比野生型 C58 低 74.86%, 这表明 *atu4546* 对下游基因具有促进作用, 为转录激活因子。在分别添加 10 mmol/L 原儿茶酸和

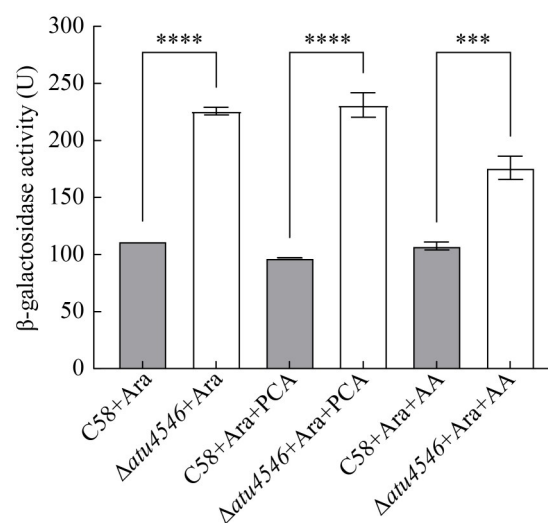


图3 基于*lacZ*报告基因评价*atu4546*对自身启动子活性的影响。C58和 $\Delta atu4546$ 在AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中生长。将10 mmol/L原儿茶酸(PCA)和15 mmol/L己二酸(AA)分别添加到AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中。显示的数据是3个独立实验的平均值, 误差线表示平均值的标准差。

Figure 3 The effect of *atu4546* on its own promoter activity was evaluated based on the *lacZ* reporter gene. C58 and $\Delta atu4546$ grew in AB-arabinose (Ara) medium. 10 mmol/L protocatechuic acid (PCA) and 15 mmol/L adipic acid (AA) were added to AB-arabinose (Ara) medium, respectively. The data displayed is the average of three independent experiments. The error line represents the standard deviation of the mean. ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$.

5 mmol/L 对羟基苯甲酸后, 野生型 C58 菌株中 β -半乳糖苷酶活性依然显著高于 $\Delta atu4546$ 菌株。在野生型 C58 中额外添加诱导物原儿茶酸和对羟基苯甲酸后, 较之有碳源阿拉伯糖(Ara)组, β -半乳糖苷酶活性分别提高了 32.24% 和 109.71%, 说明 2 种诱导物均可诱导 *atu4546* 转录, 但诱导程度不同。

2.4 *atu4546* 与靶基因启动子区结合位点的确定

为确定 PcaR 对下游靶基因的调控作用及结

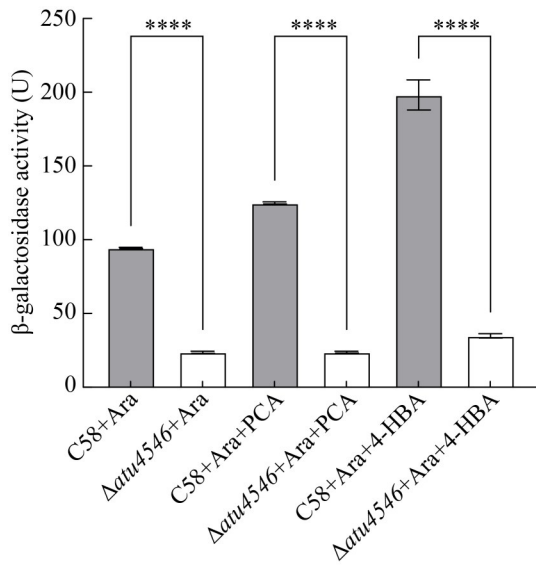


图4 基于*lacZ*报告基因评价*atu4546*对下游基因*pcaIJF*的调控作用。C58和 Δ *atu4546*在AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中生长。将10 mmol/L原儿茶酸(PCA)、5 mmol/L对羟基苯甲酸(4-HBA)分别添加到AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中。显示的数据是3个独立实验的平均值, 误差线表示平均值的标准差。

Figure 4 The regulatory effect of *atu4546* on the downstream gene *pcaIJF* was evaluated based on the *lacZ* reporter gene. C58 and Δ *atu4546* grew in AB-arabinose (Ara) medium. 10 mmol/L protocatechuic acid (PCA) and 5 mmol/L *p*-hydroxybenzoic acid (4-HBA) were added to AB-arabinose (Ara) medium, respectively. The data displayed is the average of three independent experiments. The error line represents the standard deviation of the mean. ****: $P < 0.0001$.

合位点, 首先将*atu4547*的上游调控区与 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)连接并克隆至无启动子的pCB301质粒中, 获得重组质粒pCB301-Prm*4547-lacZ*。随后将重组质粒分别转化至野生型C58和 Δ *atu4546*菌株中, 在原儿茶酸、对羟基苯甲酸和己二酸诱导下测量 β -半乳糖苷酶活性。 Δ *atu4546*中*atu4547*启动子区控制下的 β -半乳糖苷酶活性比野生型C58低21.68% (图

5A), 与报告基因原位插入靶基因*atu4549*下游的酶活结果一致, 表明*atu4546*对下游靶基因具有激活作用。为确定*atu4546*与*atu4547*启动子区域的转录因子结合位点(transcription factor binding sites, TFBS), 首先利用MEME suite^[21]预测了*atu4546*与*atu4547*启动子区域的结合序列为GTGCGATATACGAAC, 然后将*atu4547*的启动子区中预测的结合位点去除, 或随机突变成无关序列, 通过测量 β -半乳糖苷酶活性来验证预测结合位点的准确性。去除预测的结合位点后, C58和 Δ *atu4546*菌株中 β -半乳糖苷酶活性结果均无显著差异(图5B), 初步验证了所预测的DNA序列确为*atu4546*与*atu4547*启动子区域的结合位点。将预测的结合序列随机突变成无关序列后, C58和 Δ *atu4546*菌株中 β -半乳糖苷酶活性结果同样均无显著差异(图5C), 进一步验证了所预测的DNA序列确为*atu4546*与*atu4547*启动子区域的结合位点。

2.5 *atu4546*对宿主植物致病性的影响

为探究*atu4546*对根癌农杆菌致病性的影响, 本研究选择落地生根和胡萝卜2种植物进行侵染实验, 通过野生型菌株C58、基因缺失菌株 Δ *atu4546*和基因回补菌株C- Δ *atu4546*侵染2种植物后肿瘤的质量以及肿瘤中的菌落数评价几种菌株对宿主植物致病能力的强弱。肿瘤称重结果显示, *atu4546*的缺失使胡萝卜茎块和落地生根叶片上的肿瘤质量分别降低34.90%和52.58%, C- Δ *atu4546*的肿瘤质量恢复至与野生型相似水平, 表明*atu4546*基因缺失会影响根癌农杆菌的致瘤能力, 重新表达后可恢复基因缺失株的肿瘤发生(图6C、6D)。统计每0.1 g肿瘤中的菌落数结果显示, *atu4546*的缺失使胡萝卜茎块和落地生根叶片上每0.1 g肿瘤中的菌落数分别降低72.19%和80.54%, C- Δ *atu4546*的菌落数恢复至与野生型相似水平(图6E、6F)。肿瘤质量和菌落数均表明*atu4546*的缺失降低了根癌农杆菌的致病性。

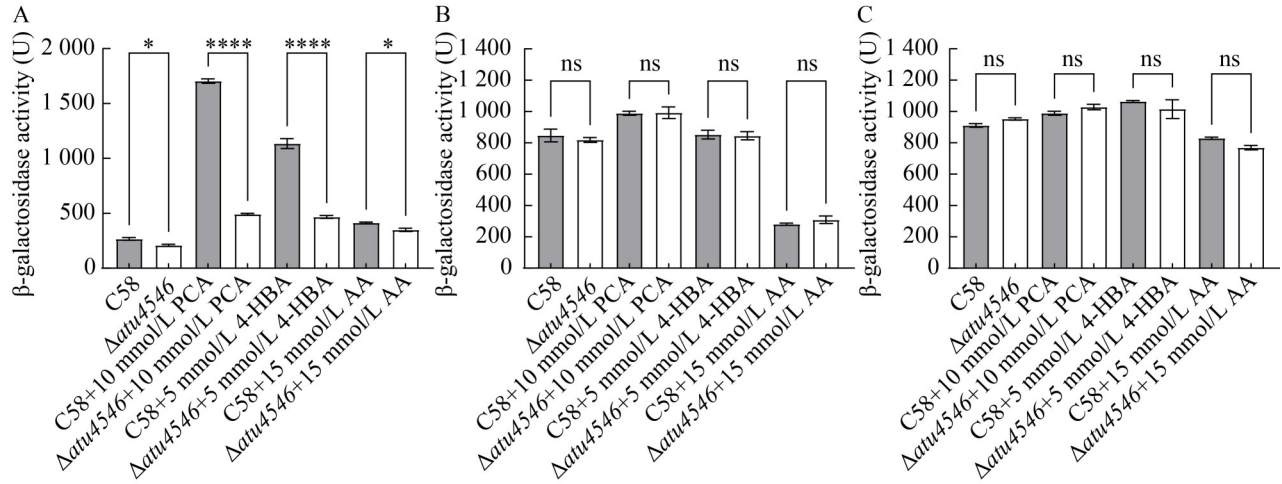


图5 改变转录因子结合位点对 $atu4546$ 调控 $atu4547$ 启动子活性的影响。A: pCB301-Prm4547- $lacZ$ 在C58和 $\Delta atu4546$ 中的 β -半乳糖苷酶活性; B: 去除pCB301-Prm4547- $lacZ$ 上TFBS后C58和 $\Delta atu4546$ 中的 β -半乳糖苷酶活性; C: 将pCB301-Prm4547- $lacZ$ 上TFBS替换为无关序列后C58和 $\Delta atu4546$ 中的 β -半乳糖苷酶活性。所有菌株在AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中生长。将原儿茶酸(PCA)、对羟基苯甲酸(4-HBA)和己二酸(AA)分别作为诱导物添加到AB-阿拉伯糖(Ara)培养基中。显示的数据为3个独立实验的平均值, 误差线表示平均值的标准差。

Figure 5 Effect of $atu4546$ on the activity of $atu4547$ promoter by changing the transcription factor binding site. A: The β -galactosidase activity of pCB301-Prm4547- $lacZ$ in C58 and $\Delta atu4546$; B: The β -galactosidase activity in C58 and $\Delta atu4546$ after removal of TFBS on pCB301-Prm4547- $lacZ$; C: The β -galactosidase activity in C58 and $\Delta atu4546$ after replacing the TFBS on pCB301-Prm4547- $lacZ$ with an unrelated sequence. All strains grew in AB-arabinose (Ara) medium. Protocatechuic acid (PCA), *p*-hydroxybenzoic acid (4-HBA), and adipic acid (AA) were added to AB-arabinose (Ara) medium as inducers, respectively. The data displayed is the average of three independent experiments. The error line represents the standard deviation of the mean. ****: $P < 0.0001$; *: $P < 0.05$; ns: Not significant.

3 讨论与结论

本文研究了根癌农杆菌 IclR 家族转录因子 PcaR 在 β -酮己二酸途径中的代谢调控作用。该基因缺失导致根癌农杆菌无法利用 4-羟基苯甲酸和原儿茶酸作为唯一碳源生长。Atu4546 对自身表达具有负调控作用, 它能够结合下游基因 $atu4547$ 启动子的调控区(结合序列为 GTGCGATATACGAAC), 激活下游基因 $atu4547$ - $atu4549$ 的表达, 进而促进 β -酮己二酸转化为 TCA 循环中间物。在不同微生物中转录因子 PcaR 的功能和调控方式既有相似之处, 又存在差异^[22-23]。在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas*

putida)中, PcaR 作为转录激活因子能够与特定的 DNA 序列结合, 激活原儿茶酸代谢相关基因的表达, 促进原儿茶酸的降解^[24]。在苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*)中, PcaR 不仅参与调控原儿茶酸代谢基因, 还存在自调控机制, 通过负自我调节维持自身及相关基因表达的平衡^[25]。在节杆菌 (*Arthrobacter*)中, PcaR 参与调控邻苯二甲酸分解代谢途径, 对邻苯二甲酸降解相关基因的表达起到调节作用, 使细菌能够有效利用邻苯二甲酸作为碳源^[26]。在不动杆菌 (*Acinetobacter*)中, $pcaR$ 与 $pcaU$ 等基因共同参与对原儿茶酸利用相关基因的调控。PcaU 是原

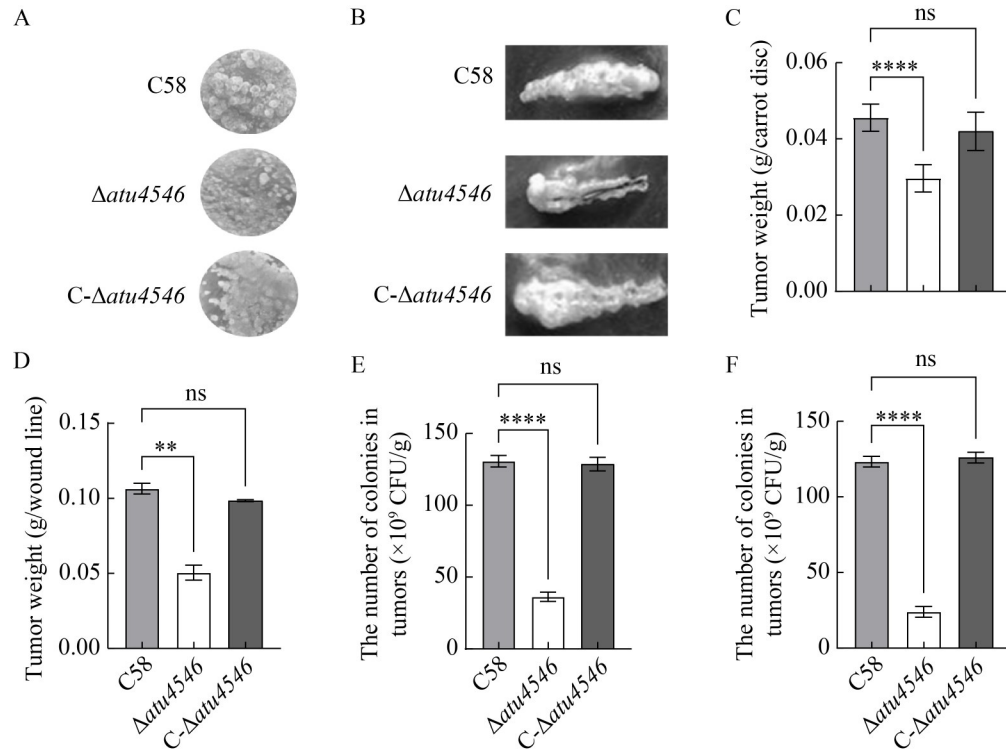


图6 *atu4546*对根癌农杆菌致病性的影响。A: 感染胡萝卜茎块4周后的肿瘤; B: 感染落地生根叶片4周后的肿瘤; C: 感染胡萝卜茎块4周后的肿瘤质量; D: 感染落地生根叶片4周后的肿瘤质量; E: 根癌农杆菌侵染胡萝卜4周后肿瘤内的菌落数; F: 根癌农杆菌侵染落地生根叶片4周后肿瘤内的菌落数。显示的数据为3个独立实验的平均值, 误差线表示平均值的标准差。

Figure 6 Effect of *atu4546* on the pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens*. A: Tumors after 4 weeks of infection with carrot stems; B: Tumors after 4 weeks of infection with the leaves of kalanchoe; C: Tumor weights after infecting the carrot stems for 4 weeks; D: Tumor weight after infecting the leaves of kalanchoe for 4 weeks; E: The number of colonies in tumors on carrots infected by *A. tumefaciens* strains after 4 weeks; F: The number of colonies in tumors from kalanchoe leaves infected by *A. tumefaciens* strains after 4 weeks. The data displayed is the average of three independent experiments. The error line represents the standard deviation of the mean. ****: $P < 0.0001$; **: $P < 0.01$; ns: Not significant.

儿茶酸利用基因的转录激活因子, PcaR 与 PcaU 在氨基酸序列上有一定的相似性, 它们可能通过与相似的 DNA 序列结合来调控基因表达^[27]。在浑浊红球菌(*Rhodococcus opacus*)中, PcaR 为转录抑制子调控原儿茶酸途径^[28]。在不同微生物中, PcaR 对 β -酮己二酸代谢的调控机制差异体现了进化的多样性, 以及微生物对不同生态位的适应特征。

atu4546 的缺失显著降低了根癌农杆菌在胡

萝卜茎块和落地生根叶片上的结瘤能力及肿瘤中的菌落数。*atu4546* 又是根癌农杆菌利用 4-羟基苯甲酸和原儿茶酸的必需基因, 可见根癌农杆菌对酚酸类物质的代谢能力很可能与致病性密切相关。酚酸类物质(如对羟基苯甲酸、原儿茶酸)既是植物信号分子, 也是细菌的碳源, 可作为碳源支持根癌农杆菌在植物体内的生长繁殖。根癌农杆菌 PcaR 通过调控酚酸代谢基因使细菌在植物体内能够利用这些碳源, 从而支持

其定殖。相比之下,当 *pcaR* 缺失时细菌无法有效分解酚酸,可能引起生长受限,进而影响对宿主植物的侵染和肿瘤形成(图 6)。这些现象表明 β -酮己二酸途径的代谢功能可能影响细菌毒力因子的表达和细胞生理状态。研究表明根癌农杆菌对酚酸类物质的有效代谢有助于其在植物体内更好地定殖和致病^[15]。此外,根癌农杆菌的致病性与毒力基因(*vir*)表达密切相关^[29]。本研究以实验室前期获得的 C58 *virB-lacZ* 为出发菌株,敲除 *atu4546*,检测 β -半乳糖苷酶的活性,发现基因缺失株中 *vir* 基因的启动子活性与出发菌株无明显差异,说明 *atu4546* 基因不会直接影响 *virB* 基因表达(数据未展示)。*Atu4546* 影响农杆菌致病性的原因可能与酚酸代谢产物间接影响毒力基因的表达相关。例如,原儿茶酸的积累可能通过 *virA/virG* 信号通路激活 *vir* 基因^[30]。一方面,*PcaR* 会激活 *PcaIJF* 表达,促进根癌农杆菌代谢酚酸;同时,*PcaR* 负调控自身表达可能通过维持酚酸代谢平衡避免过度消耗信号分子,从而优化 *vir* 基因的激活效率。这种代谢与毒力的协同自身调控机制之前也有报道,如根癌农杆菌中 *PcaQ* 通过调控原儿茶酸代谢影响 *vir* 基因表达^[13]。因此,*pcaR* 的缺失可能打破代谢与信号分子的平衡,削弱细菌对植物的侵染能力。

本研究首次揭示了根癌农杆菌 *PcaR* 通过负调控自身并激活下游基因转录,参与 β -酮己二酸途径的代谢调控,并影响其致病性。与其他细菌相比,根癌农杆菌 *PcaR* 对自身的负调控及结合位点的特异性体现了其在适应植物宿主环境中的独特进化策略。然而,仍有许多问题有待解决。在调控网络方面,*PcaR* 与其他调控因子(如 *PcaQ*)之间的互作机制尚不明确,需要进一步探究它们在全局调控网络中的协同或拮抗关系,以解析根癌农杆菌复杂的调控网络。在效应分子的作用上,虽然初步验证 β -酮己二酸可能作为 *PcaR* 的配体影响其 DNA 结合能力,但仍需通过结构生物学和生化实验进行验证,

进一步明确效应分子与 *PcaR* 的结合模式和调控细节。在与毒力基因的联系上虽然发现 *pcaR* 缺失影响根癌农杆菌的致病性,但 *PcaR* 是否直接调控毒力因子仍有待深入研究。

作者贡献声明

徐楠:实验总体设计,论文初稿撰写与修改,数据整理与管理;程爽:实验开展及论文撰写;王婉瑜:实验开展;李诚昊:协助数据处理和校对;郭敏亮:研究课题监管与指导,论文审阅与修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] FLORES-FÉLIX JD, MENÉNDEZ E, PEIX A, GARCÍA-FRAILE P, VELÁZQUEZ E. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2020, 43(1): 126046.
- [2] ABDOLLAHI MR, MOIENI A, MOUSAVI A, SALMANIAN AH, JAVARAN MJ, MAJDI M. Effect of integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system on transient GUS expression in hypocotyls of rapeseed (*Brassica napus* L. cv. PF704) microspore-derived embryos[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(18): 3141-3145.
- [3] ESCOBAR MA, DANDEKAR AM. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(8): 380-386.
- [4] HOOYKAAS PJJ. The Ti plasmid, driver of *Agrobacterium* pathogenesis[J]. *Phytopathology*, 2023, 113(4): 594-604.
- [5] ASHBY AM, WATSON MD, LOAKE GJ, SHAW CH. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward *vir*-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(9): 4181-4187.
- [6] BRENCIC A, WINANS SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(1): 155-194.
- [7] LAI EM, SHIH HW, WEN SR, CHENG MW, HWANG HH, CHIU SH. Proteomic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* response to the *vir* gene inducer acetosyringone[J]. *Proteomics*, 2006, 6(14): 4130-4136.
- [8] HARWOOD CS, NICHOLS NN, KIM MK, DITTY JL,

- PARALES RE. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(21): 6479-6488.
- [9] MICHELSE CB, REIJNEN L, OLIVAIN C, ALABOUVETTE C, REP M. Degradation of aromatic compounds through the β -ketoacid pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(9): 1089-1100.
- [10] HARWOOD CS, PARALES RE. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity[J]. Annual Review of Microbiology, 1996, 50: 553-590.
- [11] HUIJBERS MME, MONTERSINO S, WESTPHAL AH, TISCHLER D, van BERKEL WJH. Flavin dependent monooxygenases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 544: 2-17.
- [12] PARKE D. Characterization of PcaQ, a LysR-type transcriptional activator required for catabolism of phenolic compounds, from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(1): 266-272.
- [13] PARKE D. Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pcaQ* gene in response to β -carboxy-*cis*, *cis*-muconate[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(11): 3529-3535.
- [14] BERTANI I, KOJIC M, VENTURI V. Regulation of the *p*-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 6): 1611-1620.
- [15] XU N, WANG WY, CHENG S, ZUO JJ, GUO ML. Function and regulation of *pob* genes for 4-hydroxybenzoate catabolism in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025: e0025525.
- [16] YANG J, PAN XY, XU YJ, LI Y, XU N, HUANG ZW, YE JY, GAO DW, GUO ML. *Agrobacterium tumefaciens* ferritins play an important role in full virulence through regulating iron homeostasis and oxidative stress survival[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(9): 1167-1178.
- [17] 徐楠, 徐宇娟, 孙盼, 宗仁杰, 郭敏亮. 根癌农杆菌 *vbp2* 基因启动子转录调控的探析[J]. 生物技术通报, 2021, 37(12): 41-49.
- XU N, XU YJ, SUN P, ZONG RJ, GUO ML. Exploration of the transcriptional regulation of *Agrobacterium tumefaciens vbp2* promoter[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(12): 41-49 (in Chinese).
- [18] 宗仁杰, 高苗苗, 张梦琪, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 根癌农杆菌化学受体 MCP₁₉₁₂ 调节趋化响应功能的鉴定[J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1949-1961.
- ZONG RJ, GAO MM, ZHANG MQ, WANG H, XU N, GUO ML. Functional identification of *Agrobacterium tumefaciens* chemoreceptor MCP₁₉₁₂ in regulating chemotactic response[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(5): 1949-1961 (in Chinese).
- [19] GUO ML, HOU QM, HEW CL, PAN SQ. *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(10): 1201-1212.
- [20] GUO ML, JIN SG, SUN DY, HEW CL, PAN SQ. Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(50): 20019-20024.
- [21] BAILEY TL, BODEN M, BUSKE FA, FRITH M, GRANT CE, CLEMENTI L, REN JY, LI WW, NOBLE WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Suppl_2): W202-W208.
- [22] NICHOLS NN, HARWOOD CS. Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* β -ketoacid pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(24): 7033-7040.
- [23] PHAM C, NASR MA, SKARINA T, Di LEO R, KWAN DH, MARTIN VJJ, STOGIOS PJ, MAHADEVAN R, SAVCHENKO A. Functional and structural characterization of an IclR family transcription factor for the development of dicarboxylic acid biosensors[J]. The FEBS Journal, 2024, 291(15): 3481-3498.
- [24] ROMERO-STEINER S, PARALES RE, HARWOOD CS, HOUGHTON JE. Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(18): 5771-5779.
- [25] MacLEAN AM, MacPHERSON G, ANEJA P, FINAN TM. Characterization of the β -ketoacid pathway in *Sinorhizobium meliloti*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5403-5413.
- [26] LUU RA, KOOTSTRA JD, NESTERYUK V, BRUNTON CN, PARALES JV, DITTY JL, PARALES RE. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY[J]. Molecular Microbiology, 2015, 96(1): 134-147.
- [27] GERISCHER U, SEGURA A, ORNSTON LN. PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(6): 1512-1524.
- [28] DIAO JJ, CARR R, MOON TS. Deciphering the transcriptional regulation of the catabolism of lignin-derived aromatics in *Rhodococcus opacus* PD630[J]. Communications Biology, 2022, 5: 1109.
- [29] KRISHNAMOHAN A, BALAJI V, VELUTHAMBI K. Efficient *vir* gene induction in *Agrobacterium tumefaciens* requires *virA*, *virG*, and *vir* box from the same Ti plasmid[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(13): 4079-4089.
- [30] BOLTON GW, NESTER EW, GORDON MP. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence[J]. Science, 1986, 232(4753): 983-985.