

灰霉病菌XI型组氨酸激酶基因 *BcHK91* 的功能分析

金珂宇^{1#}, 王梦晶^{1#}, 沈诗焱¹, 武婧雨¹, 李岳谦¹, 郭俭², 王教瑜^{3*},
李玲^{1*}

- 1 浙江农林大学 现代农学院, 全省作物病虫生物学与生态调控重点实验室, 浙江 杭州
- 2 浙江农林大学 食品与健康学院, 浙江 杭州
- 3 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州

金珂宇, 王梦晶, 沈诗焱, 武婧雨, 李岳谦, 郭俭, 王教瑜, 李玲. 灰霉病菌XI型组氨酸激酶基因 *BcHK91* 的功能分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 5054-5073.

JIN Keyu, WANG Mengjing, SHEN Shiyi, WU Jingyu, LI Yueqian, GUO Jian, WANG Jiaoyu, LI Ling. Functions characterization of the group XI histidine kinase gene *BcHK91* in *Botrytis cinerea*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(11): 5054-5073.

摘要: 【目的】探索灰霉病菌中XI型组氨酸激酶基因的功能, 为进一步阐明组氨酸激酶(histidine kinases, HKs)相关基因在植物病原菌生长发育和致病过程中的分子机制奠定基础。【方法】利用敲除载体构建、根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformant, ATMT)、PCR及qPCR验证技术获得*BcHK91*基因敲除突变体。通过对菌落生长、菌核形成、孢子产量及形态、孢子萌发率、附着胞与侵染垫形成率、致病力、细胞壁与细胞膜完整性以及转录组进行测定, 探究敲除该基因后对灰霉病菌B05.10的影响, 从而明确*BcHK91*的功能。【结果】成功获得2个*BcHK91*基因敲除突变体, 分别命名为 $\Delta BcHK91$ -A与 $\Delta BcHK91$ -B。表型分析发现, 与野生型菌株B05.10和异位插入菌株(ectopic transformants, ET)相比, *BcHK91*基因敲除突变体不产生菌核, 孢子长度缩短, 产孢能力、孢子萌发率、附着胞形成率、侵染垫形成率及致病力均下降, 对刚果红和SDS的敏感性升高。利用RNA sequencing (RNA-seq)技术对野生型菌株和突变体 $\Delta BcHK91$ 的转录组进行比较分析, 结果表明共有1533个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 其中1017个基因上调, 516个基因下调。基因本体(gene ontology, GO)和直系同源簇(cluster of orthologous group, COG)注释分析表明, DEGs主要富集在生物过程(biological processes)中的细胞过程(cell process)与代谢过程(metabolic process); 细胞组成(cellular components)主要分布在细胞结构体(cellular anatomical entity)和细胞内(intracellular); 分子功能(molecular functions)主要富集在催化活性(catalytic activity)、蛋白质结合(binding)和转运活性(transporter

资助项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2023C02018); 国家大学生创新创业训练计划(202210341033)

This work was supported by the Zhejiang Province Leading Earth Goose Program (2023C02018) and the National College Students Innovation Training Program (202210341033).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: WANG Jiaoyu, wangjiaoyu78@sina.com; LI Ling, lilong-06@163.com

Received: 2025-04-11; Accepted: 2025-07-26; Published online: 2025-08-21

activity)。Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)通路分析表明, DEGs 主要富集在碳水化合物运输、淀粉和蔗糖代谢通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应的代谢通路上, 参与调控突变体表型与致病性。差异表达基因的 *in silico* 分析揭示, 17 个基因可能参与调控 B05.10 的生长发育、氧化应激、细胞壁合成、细胞膜完整性、菌核形成和致病性。qPCR 验证结果表明, 13 个基因的 qPCR 表达水平与转录组测序获得的数据趋势一致, 表明该转录组数据可信度较高。【结论】灰霉菌菌中 *BcCHK91* 主要在菌体无性繁殖、应对不同环境胁迫及致病过程中发挥重要作用。

关键词: 灰霉菌; XI型组氨酸激酶; *BcCHK91*; 功能研究; 转录组

Functions characterization of the group XI histidine kinase gene *BcCHK91* in *Botrytis cinerea*

JIN Keyu^{1#}, WANG Mengjing^{1#}, SHEN Shiyi¹, WU Jingyu¹, LI Yueqian¹, GUO Jian², WANG Jiaoyu^{3*}, LI Ling^{1*}

1 Zhejiang Key Laboratory of Biology and Ecological Regulation of Crop Pathogens and Insects, College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

2 College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

3 Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To explore the functions of type XI histidine kinase genes in *Botrytis cinerea*, thereby establishing a foundation for further elucidation of the molecular mechanisms involving histidine kinase-related genes in the growth, development, and pathogenic processes of plant pathogenic fungi. [Methods] Through knockout vector construction, ATMT transformation, and PCR/qPCR validation, we obtained the mutant $\Delta BcCHK91$. The colony growth, sclerotium formation, conidial production and morphology, conidial germination rate, appressorium and infection cushion formation rates, pathogenicity, cell wall/membrane integrity assays and transcriptome profiling were conducted to evaluate the effect of *BcCHK91* knockout on *B. cinerea* strain B05.10, thereby elucidating the biological function of this gene. [Results] Two *BcCHK91* knockout mutants were successfully obtained and designated as $\Delta BcCHK91-A$ and $\Delta BcCHK91-B$. The phenotypic analysis revealed that the knockout of *BcCHK91* reduced the conidial length, conidial production, conidial germination rate, appressorium formation rate, infection cushion formation rate, and pathogenicity. Moreover, the mutant formed no sclerotium and showed increased sensitivity to Congo red and SDS compared with the wild-type strain B05.10 and the ectopic insertion strain ET. To reveal the transcription mechanisms of *BcCHK91*, we compared the transcriptomes of B05.10 and $\Delta BcCHK91$ by RNA-seq. A total of 1 533 differentially expressed genes (DEGs) were predicted in $\Delta BcCHK91$, including 1 017 genes with up-regulated expression and 516 genes with down-regulated expression. Gene ontology (GO) and clusters of orthologous

groups (COG) annotation showed that the DEGs were mainly involved in cell process and metabolic process of biological processes, cellular anatomical entity and intracellular of cellular components, and catalytic activity, binding, and transporter activity of molecular functions. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis showed that the DEGs were mainly involved in carbohydrate transport and metabolism, starch and sucrose metabolism, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade response and other physiological metabolic pathways related to the phenotype and pathogenicity of $\Delta BcHK91$. *In silico* analysis of the DEGs suggested that 17 DEGs were related to the growth and development, oxidative stress, cell wall biosynthesis, cell membrane integrity, sclerotial initials, and pathogenicity. The results of qPCR demonstrated that the expression levels of 13 genes matched the trends observed in RNA-seq data, confirming the high reliability of the transcriptome analysis. **[Conclusion]** In *B. cinerea*, *BcHK91* plays critical roles in asexual development, environmental stress responses, and pathogenicity.

Keywords: *Botrytis cinerea*; group XI histidine kinase; *BcHK91*; functional research; transcriptome

灰霉病是全球范围内蔬菜、水果及鲜花上的重要病害，在水果采摘及运输过程中均可发生，一般导致减产 20%–40%，严重时减产可达 90% 以上，对经济造成严重影响。据报道，死体营养型灰霉病菌是全球第二大危害严重的真菌^[1]。灰霉病的病原物为灰霉病菌，其有性态为富氏葡萄孢盘菌 [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.]，属于囊菌门葡萄孢属；无性态为灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.)，属半知菌类葡萄孢属^[2]。双组分信号系统 (two-component signaling system) 是一种广泛存在于细菌和真菌中的信号传导机制，用于感知和响应外界环境变化^[3]。在真核生物中，双组分信号系统演化为多步骤磷酸化传递途径，该途径包括 3 类信号传递分子：组氨酸激酶 (histidine kinases, HKs)、组氨酸的磷酸转移中间体 (histidine phosphotransfer protein, HPt) 和响应调节蛋白 (response regulator protein, RR)^[4]。此系统中的 HKs 为杂合型 HKs (hybrid histidine kinase)，除具备信号输入域与激酶催化域外，其 C 末端还含有基于天冬氨酸残基 (aspartic acid residue, Asp) 的接收域 (receiver domain)；而 HPt 作为磷酸传递的专用中介蛋白，通过保守组氨酸位点接收 HKs 转移的磷酸基团，进而将其传递至 RR 以激活下游信号响应。在外界环境刺激下 HK 被激

活，其激酶域内组氨酸残基 (histidine residue, His) 发生自磷酸化，该磷酸基团随后转移至 HK 自身 C 端接受域的 Asp 残基，进而经 HPt 蛋白的 His 残基传递至 RR 接受域内的 Asp 残基，最终激活 RR 的效应结构域并启动信号输出^[5-7]。

HK 是双组分信号系统的上游因子，激活后能使病原菌对各种环境信号作出响应。不同物种中 HKs 的作用存在差异：在细菌中 HK 能使其感知并响应外界环境刺激，如化学物质浓度、光照、温度、渗透压等^[8]；在真菌中 HK 具有更为广泛的功能，在许多植物病原真菌中参与调控菌丝形态、生长发育、致病性、渗透胁迫、氧胁迫、杀菌剂抗性等反应过程^[9]。此外，不同真菌中 HKs 基因的数量和功能也有所不同。例如，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中只含有一个 *Sln1*，粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中有 3 个，串珠赤霉菌 (*Gibberella moniliformis*) 中有 16 个，异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 中有 21 个，稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 中有 11 个，灰霉病菌 (*B. cinerea*) 中有 20 个^[6]。真菌中的这些基因根据结构域不同划分为 11 类，研究较多的 HKs 类型为 III 型和 VI 型^[6]。酿酒酵母中唯一的 HKs 基因 *Sln1* 属于 VI 型，缺失后会引发高渗透压甘油 (high-osmolarity glycerol, HOG) 信号途径持续

激活, 导致体内甘油积累过多而死亡; 稻瘟菌中 *MoSln1* 敲除突变体对细胞壁胁迫试剂卡式白的敏感性下降, 但对氧化胁迫、金属胁迫和渗透压的敏感性上升, 且致病力丧失; 赤霉病菌中 VI 型 HKs 基因 *FgSln1* 缺失并不会导致病原菌死亡, 但会使菌丝分枝减少, 致病性下降; 而在灰霉病菌中 *BcSln1* 敲除后导致菌株生长速率变慢、产孢量减少、孢子形态发生变化且不产生菌核, 但不参与调控致病性、渗透胁迫和对杀菌剂的敏感性^[10-13]。粗糙脉胞霉(*Neurospora crassa*)中 III 型 HKs 基因 *NcNIK-1/OS-1* 参与调控菌丝生长、细胞渗透压和杀菌剂(异菌脲和咯菌腈)的抗性; 甘蓝链格孢菌(*Alternaria brassicicola*)中 *AbNIK1* 基因缺失突变体致病力丧失, 渗透胁迫敏感性上升, 对二甲酰亚胺及苯基吡咯类杀菌剂抗性增强, 但菌株生长不受影响; 灰霉病菌 *BOS1* 基因编码 III 型 HKs, *BOS1* 敲除后会影响菌株分生孢子的产生及致病力, 还会增强菌株对渗透胁迫的敏感性及对杀菌剂咯菌腈、异菌脲和五氯硝基苯的抗性, 但不会导致氧化应激敏感性增加^[14-17]。*N. crassa* 存在 1 个 XI 型 HKs 基因 *DCC-1*, 参与调控分生孢子产生、子囊壳发育和胡萝卜素形成; 稻瘟病菌同样也存在 1 个 XI 型 HKs 基因 *MoHik3*, 该基因缺失对稻瘟病菌的生长发育和致病性无显著影响, 也不参与渗透胁迫^[18-19]。然而, 灰霉病菌中 XI 型 HKs 基因的功能尚未被发掘。因此, 本研究随机选取其中一个 XI 型 HKs 基因进行功能分析, 在获得 *BcHK91* 基因单敲除突变体的基础上对该基因进行表型分析等研究, 从而明确 *BcHK91* 基因在应对胁迫反应、病菌生长发育和致病过程中的功能, 以期揭示灰霉病菌 *BcHK91* 基因的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

供试菌株为灰霉病菌野生型标准菌株

B05.10, 于完全培养基(complete medium, CM)^[20]上在 22 °C 条件下进行培养。菌株短期保存于 4 °C 试管斜面, 长期保存于 -80 °C。

1.2 *BcHK91* 生物信息学分析

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上获取 *BcHK91* 的氨基酸序列, 通过 NCBI BLASTp 寻找同源蛋白。利用 GeneDoc 软件对 *BcHK91* 及同源蛋白的氨基酸序列进行比对, 再导入 MEGA 11 软件构建系统发育树。通过 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 网站预测蛋白结构域, 并在 DOG 软件上进行绘制。

1.3 *BcHK91* 基因敲除及转化子验证

将灰霉病菌接种于液体完全培养基, 静置于 22 °C 培养箱中黑暗培养 3 d 后收集菌丝。利用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取灰霉病菌菌丝基因组 DNA。基于同源重组原理, 通过长片段 PCR 扩增技术构建 *BcHK91* 基因敲除载体: 以提取的 DNA 为模板, 分别用上游同源臂引物(UP-F/UP-R)和下游同源臂引物(DN-F/DN-R)扩增 *BcHK91* 基因的上游片段(UP)与下游片段(DN)。PCR 反应体系(50 μL): 2×Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 18 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。将两片段依次插入携带潮霉素抗性基因(hygromycin resistance gene, *hph*)的敲除载体中。利用根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformant, ATMT)将敲除载体导入到野生型灰霉病菌 B05.10 中, 获得可能的转化子在含潮霉素 B (终浓度为 200 μg/mL) [生工生物工程(上海)股份有限公司]的完全培养基平板上进行单孢分离纯化。经 PCR 验证(反应

体系及条件同前), 筛选获得敲除突变体和异位整合突变体(ectopic transformants, ET), 随机选取其中 2 个突变体 $\Delta BcHK91-A$ 和 $\Delta BcHK91-B$ 进行 RT-qPCR 验证及后续实验。利用真菌总 RNA 快速抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取样品总 RNA, 以 1 μg RNA 为模板, 采用 HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股

份有限公司)合成 cDNA; 通过 qPCR 对敲除结果进行验证, 以内参基因 *UCE* (ubiquitin conjugating enzyme) 为参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法计算靶基因的相对表达水平。试验设置 3 次生物学重复。本研究用到的引物见表 1, 所有引物均由杭州有康生物科技有限公司合成。

1.4 菌丝生长及菌核产生测定

将 B05.10、 $\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 和

表1 本研究使用的引物
Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
UP-F	GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGATTTGTGAGTAATTTTCAGTGCTCC
UP-R	CCAGGATCCTCTAGAGTCGACTATCTCCACACAATGGAGTTTGT
DN-F	CCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTTCAACGATATCAAGGATTACAA
DN-R	ATTATTATGGAGAACTCGAGACTTTTAACGAGAGACGAATGAAG
HPH-F	TTCGCCCTCCTCCCTTTATTTCA
HPH-R	GCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACG
BcHK91-F	ACTCAGTGCGGATCGGGACATTCT
BcHK91-R	GAAGGGTGTACCATTGTTCCGCGA
BcHK91-UP	AGCTACCAGAGGAAAGTTGTACTC
BcHK91-DN	TGAATGGTGTGAGTGTAGGCAAC
HPH-UP	ACTGCTACAAGTGGGGCTGATCTG
HPH-DN	CTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGT
QBcHK91-F	ATGAGGCCTGGACAAGAATCACAGGTGG
QBcHK91-R	AAGGGTGTACCATTGTTCCGCGACAAATT
UCE-F	ACCGGAGGTGTCTTCTTCCCTCGCC
UCE-R	ATGCTTCCGTTGGAGTTGATGTTTGGGT
BCIN_07g06780-F	CCGGTGACAACGCTACCTGCAATG
BCIN_07g06780-R	AGTCATGTTGTGGCCATCGATTGCG
BCIN_15g02270-F	GCGTGGTTCTTGGGAGAGTTCGTC
BCIN_15g02270-R	GCATCCACGTCAAACCACTGCAAG
BCIN_02g07770-F	TCCGATGCCGTTGTAGGATTGCC
BCIN_02g07770-R	GTTGGTGACAAACCACCTGTG
BCIN_05g00730-F	CGTCTTCGATCTCACCCACGTCTGG
BCIN_05g00730-R	GGAGGGTTCGAGTCCTGGTACCAAG
BCIN_05g04650-F	TCACGCTCCGATAATAGTGAGCT
BCIN_05g04650-R	TTCCAAGGACAGTCATTGGCAACG
BCIN_07g01120-F	AAGGTTCAATCATCGGGCCAGCAT
BCIN_07g01120-R	ATAGCAGTCGAGAGCTTTGCGAGT
BCIN_07g07130-F	CCATCCACTAGCCAAATATCCCCTG
BCIN_07g07130-R	GTCCATGCTTCGGGTGTGATGAAT
BCIN_13g02170-F	GTGCACAGTCAGATGTTGAGACCT
BCIN_13g02170-R	CTTCCCTGCATTGGGCCCCATTAAC
BCIN_14g05360-F	GGATCGGCTTTCTTTGGCTGTTGG
BCIN_14g05360-R	ACTTTGCGAAAGCTCCTCCGATAG
BCIN_15g02380-F	AAGTTCTCCACTGTCGCTGCTACCG
BCIN_15g02380-R	GGAAGTGTAACCAAGTGCCGACGAG
BCIN_02g08760-F	ACCGAGCCACACAAACGTAAAGCC
BCIN_02g08760-R	CGACCGTTAACCGTTGGAACACCA
BCIN_07g01270-F	TTACCGCAGCTCCTAGCGATAACT
BCIN_07g01270-R	CGGTGGCGCTGTTTGTACTTAGAT
BCIN_01g11450-F	GCTTCAGCCTCTCGTTCTGTCACT
BCIN_01g11450-R	TCCGGGCTGATATATGCGATGGCG

ET 菌株分别接种于完全培养基上, 在 22 °C 培养箱中黑暗培养 2 d 后, 用打孔器分别在各菌株边缘打取直径为 5 mm 的菌丝块, 接种于新的完全培养基平板上, 放置于 22 °C 培养箱中分别培养 2、3、5、7、9 d 后拍照并统计菌丝生长情况, 同时计算各突变体菌株与野生型菌株 2 d 的相对生长速率。将培养 3 d 的各菌株置于 4 °C 冰箱培养 22 d 后, 拍照记录菌核面积与个数, 使用 ImageJ 软件计算单一菌核面积与菌核个数。每处理设置 3 次生物学重复, 每个生物学重复进行 4 次技术重复检测。

1.5 孢子产量及形态观察

将培养 9 d 的 B05.10、 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 和 ET 菌株使用涂布棒将平板上的孢子洗下后用三层擦镜纸过滤孢子液, 使用血球计数板统计不同菌株的产孢量, 实验设 3 次重复。将孢子液浓度调成 1×10^5 个/mL, 取 20 μ L 放于显微镜下统计不同菌株孢子的长和宽。试验设置 3 次生物学重复, 每重复含 3 个技术单元(100 孢子/单元)。

1.6 孢子萌发率及附着胞形成率测定

取 20 μ L 采用 2 mmol/L 果糖配制的含 1×10^5 个/mL 浓度的各菌株孢子液, 滴加在疏水膜上, 将其置于 22 °C 和 >95% RH 环境中保湿培养。分别于培养后 2、4、6、8、10、12、24、48 h 在显微镜下观察并统计各菌株的孢子萌发率; 并于 8、10、12、24、48 h 时同步观察并统计各菌株附着胞形成率。试验设置 3 次生物学重复, 每重复含 3 个技术单元(100 孢子/单元)。

1.7 侵染垫形成率测定

将完全培养基上培养 9 d 的各菌株孢子配制成 20 μ L 5×10^4 个/mL 的孢子悬液后, 分别接种到玻片和洋葱表皮上, 置于 22 °C 的高湿度培养箱中孵育。在 24 h 和 48 h 观察玻片上侵染垫的形成情况并拍照记录, 统计侵染垫的形成率。在洋葱表皮上培养 30 h 后, 用乳酸石炭酸棉蓝染色液对侵染垫进行染色观察, 并在显微镜下

拍照。试验设置 3 次生物学重复, 每重复含 3 个技术单元(100 孢子/单元)。

1.8 致病力测定

采用菌丝块接种法^[21]进行致病性测定。将接种后的大豆、番茄叶片及草莓、小番茄果实置于 22 °C 培养箱中保湿培养 3 d 后, 拍照并利用 ImageJ 计算病斑面积。试验设置 3 次生物学重复, 每重复含 3 个技术单元。

1.9 细胞壁和细胞膜胁迫测定

将 22 °C 培养箱中培养 3 d 的 B05.10、 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 和 ET 菌株沿着菌落外侧边缘用打孔器打取直径为 5 mm 的圆形菌饼, 分别接种于含细胞壁胁迫因子 0.3 mg/mL 刚果红和细胞膜胁迫因子 0.05 mg/mL SDS 的完全培养基平板上。22 °C 培养 3 d 后量取菌落直径, 以完全培养基平板作为对照组, 计算各菌株菌丝生长抑制率。试验设置 3 次生物学重复, 每重复含 4 个技术单元。

1.10 RNA-seq 测序

分别将野生型菌株 B05.10 和突变体菌株 $\Delta BcHK91$ -A 在液体完全培养基中培养 4 d, 收集新鲜菌丝体, 置于液氮中保存, 送北京百迈克生物科技有限公司进行 RNA-seq 测序分析。

1.11 差异基因表达分析谱

野生型菌株 B05.10 和突变体菌株 $\Delta BcHK91$ -A 样本中表达水平存在显著差异的基因称之为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。通过差异表达分析获得的基因集合叫作差异表达基因集, 根据两(组)样品之间表达水平的相对高低差异, 表达基因可划分为上调基因(up-regulated gene)和下调基因(down-regulated gene)。利用 FPKM 方法计算基因表达量。利用 edgeR 软件分析野生型和突变体 $\Delta BcHK91$ 的差异表达情况。以 \log_2 fold change=2, FDR<0.01 作为差异表达基因的筛选条件。对获得的 DEGs 进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 推测 DEGs 的主要生物学功能及参与的代谢通路。

1.12 qPCR 验证差异表达基因

为了验证 RNA-seq 测序结果的准确性, 分别以野生型菌株 B05.10 和突变体菌株 $\Delta BcHK91$ -A 的 RNA 为模板, 通过 qPCR 测定了 13 个 DEGs 的表达水平。用目的基因 ID 检索 NCBI GenBank 数据库获取目标基因的序列, 然后依据其 CDS 区序列, 使用 Primer 5.0 软件设计引物, 并在 GenBank 数据库进行特异性检测。qPCR 引物见表 1。

1.13 显微镜观察与图像分析

使用显微镜(Olympus 公司)观察分生孢子形态、分生孢子梗簇、附着胞及侵染垫。ImageView 软件用于成像。使用相机(尼康公司)拍摄菌株形态、菌核及致病性的图像。所有图像均使用 Adobe Photoshop 2020 进行处理。

2 结果与分析

2.1 BcHK91 的获得及生物信息学分析

通过同源序列比对, 基于 NCBI 数据库鉴定出灰霉病菌基因 Bc_12791 (登录号为 BCIN_15g04540), 将其命名为 BcHK91。BcHK91 的开放阅读框长 2 359 bp, 包含 2 个外显子和 1 个内含子, 编码 752 个氨基酸。系统发育树和蛋白同源性比对结果表明 BcHK91 的同源蛋白也存在于其他真菌中, 其与 *Monilinia fructicola* (KAG4026253.1) 的同源性最高, 相似度为 70.2% (图 1A、1B)。通过 Pfam 软件对 BcHK91 的蛋白结构域进行预测发现, BcHK91 蛋白包含 period-ARNT-single-minded domain (PAS)、histidine kinase A (HisKA) 和 histidine kinase-like ATPase (HATPase_c) 结构域(图 1C)。结果表明, BcHK91 也存在于其他真菌中, 并且与其同源蛋白高度保守。

2.2 BcHK91 基因敲除突变体的获得

为探究 BcHK91 基因在灰霉病菌中的功能, 利用同源重组的原理构建了敲除载体(图 2A)。通过 ATMT 的方法将敲除片段转入野生型菌株

中, 并对得到的转化子进行 DNA 的提取、PCR 与 qRT-PCR 验证(图 2B、2C)。随机选取 2 个突变体 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 和异位插入 ET 菌株进行后续实验。

2.3 BcHK91 基因参与调控灰霉病菌菌核的形成

为探究 BcHK91 对灰霉病菌菌丝生长的影响, 对 B05.10、 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 和 ET 菌株生长 2-8 d 的情况进行了观察与分析(图 3A)。结果发现在培养 2 d 时, $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 的菌落生长直径与 B05.10 和 ET 相比无显著差异(图 3B)。此外, 菌核作为灰霉病菌越冬存活的专化休眠结构, 其发育能力直接影响病原菌的生态适应性。突变体表型分析发现, 在培养 20 d 时 B05.10 和 ET 菌株产生菌核, 而 $\Delta BcHK91$ -A 和 $\Delta BcHK91$ -B 菌株完全丧失产菌核能力(图 3C)。结果表明, BcHK91 基因不参与菌丝生长过程, 但影响灰霉病菌的有性生殖过程, 控制菌核的形成。

2.4 BcHK91 基因参与调控灰霉病菌孢子形态及产量

为研究 BcHK91 基因敲除对孢子形态的影响, 在显微镜下统计了 B05.10、 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 和 ET 菌株孢子的长度和宽度, 发现 $\Delta BcHK91$ -A、 $\Delta BcHK91$ -B 在长度上显著小于 B05.10 和 ET 菌株, 而在宽度上则无明显差异(图 4A、4B)。结果表明, BcHK91 基因的缺失减少了孢子的长度。此外, 突变体培养 9 d 的产孢量均显著小于 B05.10 和 ET 菌株(图 4C)。结果表明, BcHK91 基因参与调控灰霉病菌分生孢子的形成。

2.5 BcHK91 基因的敲除影响灰霉病菌分生孢子的萌发与附着胞的形成

为探索 BcHK91 基因敲除对灰霉病菌孢子萌发率与附着胞形成率的影响, 测定了突变体的孢子萌发率以及附着胞形成率。在 2、4、6 h 时与 B05.10 和 ET 菌株相比, $\Delta BcHK91$ -A 和

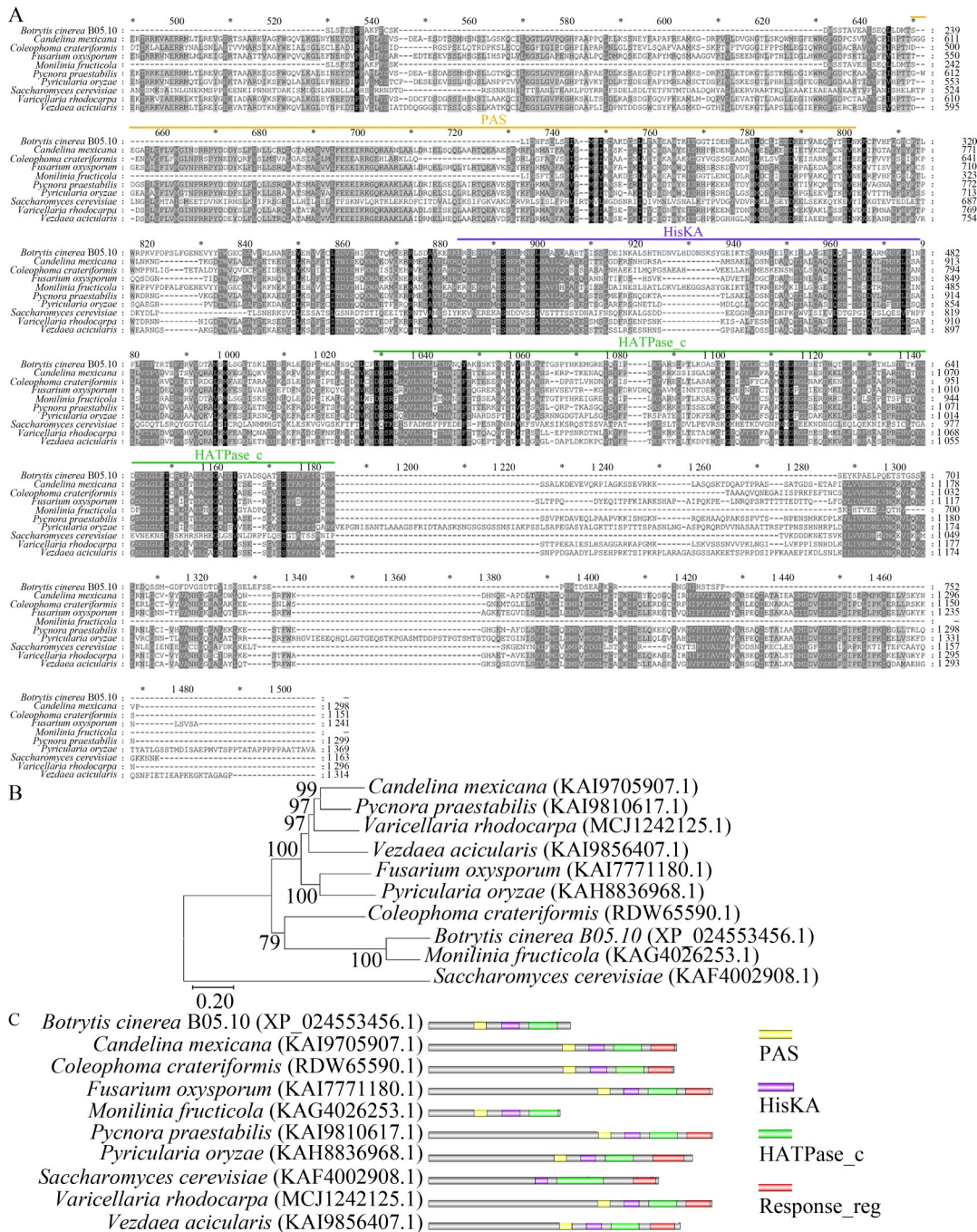


图1 BcHK91的生物信息学分析。A: BcHK91和其他相关真菌物种的同源蛋白序列比对; B: BcHK91同源蛋白的系统发育树[括号中的序号为登录号, 节点处数字表示自展支持率(基于1 000次重复检验), 标尺表示每个氨基酸位点的平均替换数为0.20]; C: BcHK91的结构域架构。

Figure 1 Bioinformatics analysis of BcHK91. A: Alignment of homologous protein sequences of BcHK91 and other related fungal species; B: Phylogenetic tree of homologous proteins of BcHK91 [The numbers at the nodes represent bootstrap support values (based on 1 000 replicate tests), and the scale bar indicates that the average number of substitutions per amino acid site is 0.20]; C: Domain architecture of BcHK91.

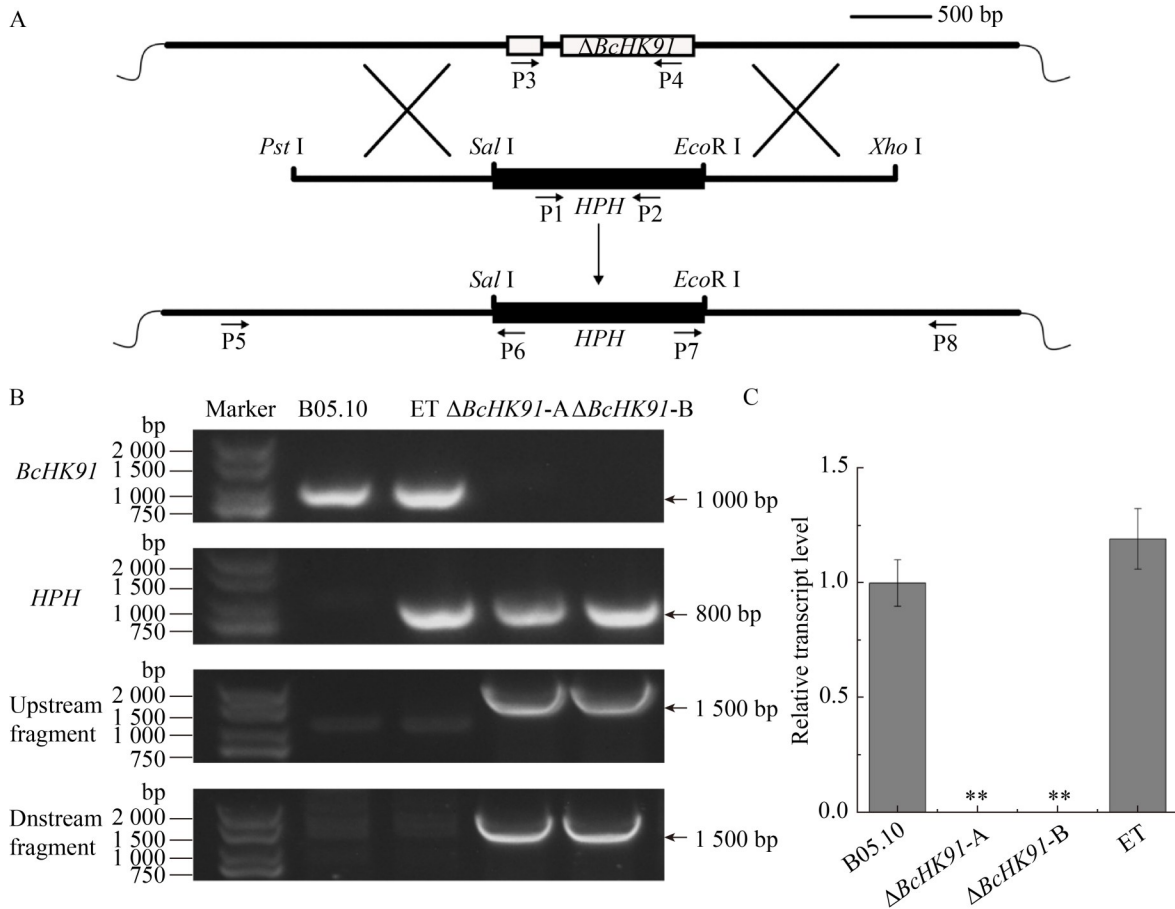


图2 *BcHK91*基因敲除及验证。A: *BcHK91*编码区被*HPH*替换图示(P1、P2为*HPH*-F/*HPH*-R; P3、P4为*BcHK91*-F/*BcHK91*-R; P5、P6为*BcHK91*-UP/*HPH*-UP; P7、P8为*BcHK91*-DN/*HPH*-DN); B: PCR验证; C: qRT-PCR验证。

Figure 2 *BcHK91* gene knockout and verification. A: Diagram of *HPH* replacement in the coding region of *BcHK91* (P1 and P2 represent *HPH*-F/*HPH*-R; P3 and P4 represent *BcHK91*-F/*BcHK91*-R; P5 and P6 represent *BcHK91*-UP/*HPH*-UP; P7 and P8 represent *BcHK91*-DN/*HPH*-DN); B: PCR verification; C: qRT-PCR verification. **: $P < 0.01$.

$\Delta BcHK91-B$ 菌株的孢子萌发率显著下降; 在 8 h 之后, 突变体菌株的萌发率相比 B05.10 和 ET 菌株则无明显差异(图 5A)。此外, 与 B05.10 和 ET 菌株相比, $\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 的附着胞形成率显著下降(图 5B)。结果表明, *BcHK91* 基因参与调控分生孢子前期的萌发与附着胞的形成过程。

2.6 *BcHK91* 基因突变降低了灰霉菌菌侵染垫的形成率

为明确 *BcHK91* 基因敲除对灰霉侵染垫形成

的影响, 分别在载玻片和洋葱表皮上开展了侵染垫形成测定。在载玻片上, 无论是 24 h 还是 48 h, 突变体侵染垫形成的数量和面积均显著低于野生型和 ET (图 6A–6C)。同样地, 在洋葱表皮上也观察到突变体侵染垫形成的数量显著少于野生型和 ET 菌株(图 6D、6E)。结果表明, *BcHK91* 基因参与调控侵染结构的形成。

2.7 *BcHK91* 基因参与灰霉菌的致病性

为确定 HKs 基因 *BcHK91* 是否与灰霉菌菌

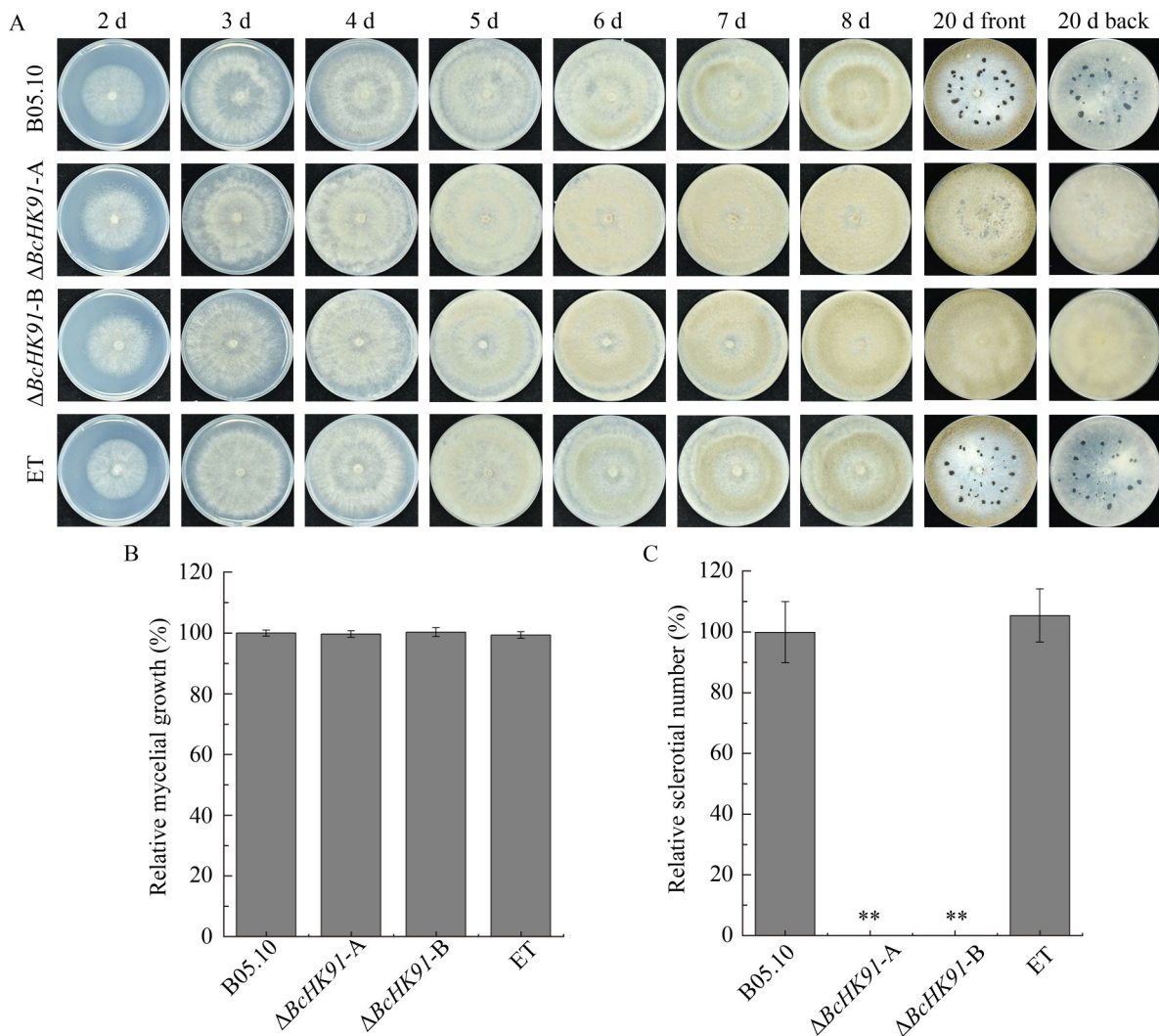


图3 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌菌丝生长和菌核的影响。A: 野生型B05.10、 $\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 和异位整合突变体(ectopic transformants, ET)菌株在完全培养基平板上培养2–8 d后的菌丝生长及20 d时的菌核形成情况; B: 在完全培养基平板上培养2 d时的菌株直径; C: 在完全培养基平板上培养20 d后的菌核数量。

Figure 3 The impact of *BcHK91* knockout on hyphal growth and sclerotia formation in *Botrytis cinerea*. A: Mycelial growth of wild-type B05.10, $\Delta BcHK91-A$, $\Delta BcHK91-B$, and ET (ectopic transformants) strains cultured on CM plates for 2–8 d and sclerotia formation at 20 d; B: Strain diameter measured at 2 d of incubation on CM plates; C: Number of sclerotia were measured after 20 d of incubation on CM plates. **: $P < 0.01$.

致病性相关, 将 B05.10、 $\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 和 ET 菌株的菌饼分别接种于健康的大豆叶片、番茄叶片、草莓果实和番茄果实上, 3 d 后拍照记录并统计病斑面积(图 7A、7C、7E、7G)。 $\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 形成的病斑面积显著小于 B05.10 和 ET 菌株(图 7B、

7D、7F、7H)。结果表明, *BcHK91* 基因缺失降低了灰霉病菌的致病力。

2.8 *BcHK91* 基因调控灰霉病菌对细胞壁和细胞膜胁迫因子的敏感性

为确定 *BcHK91* 基因是否参与调控菌体对细胞壁和细胞膜胁迫因子的敏感性, 将 B05.10、

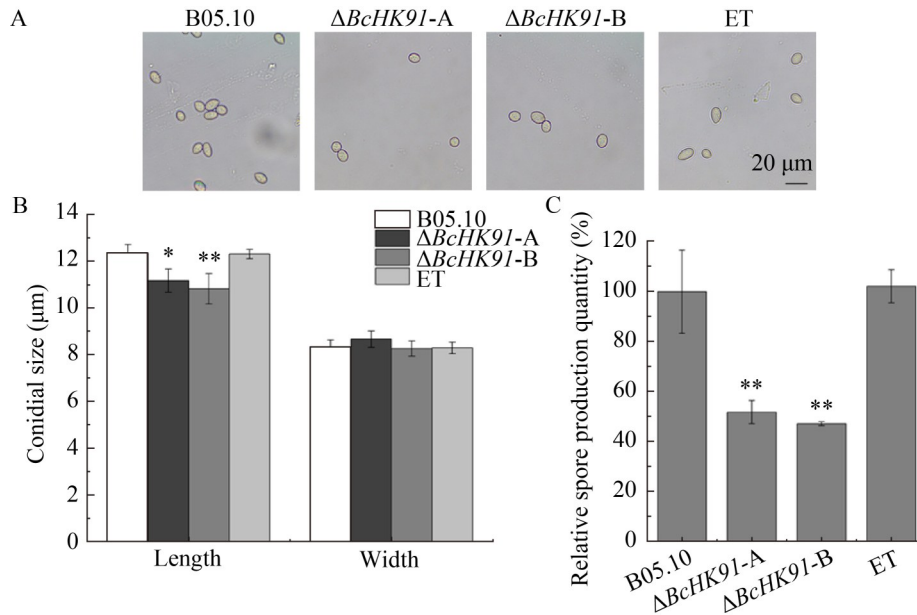


图4 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌孢子形态和产孢量的影响。A: 孢子形态的显微观察; B: 孢子的长度和宽度; C: 在完全培养基平板上培养9 d后菌株的产孢量。

Figure 4 The impact of *BcHK91* knockout on spore morphology and production in *Botrytis cinerea*. A: Microscopic observation of spore morphology; B: Length and width of spore; C: Spore production of strains cultured on CM plates for 9 d. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

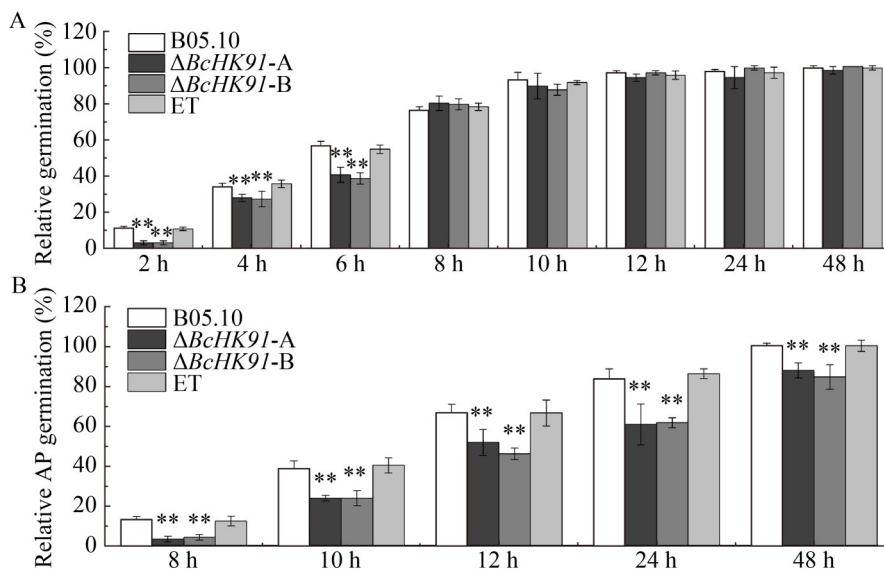


图5 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌孢子萌发率和附着胞形成率的影响。A: 2、4、6、8、10、12、24、48 h时的孢子萌发率; B: 8、10、12、24、48 h时的附着胞形成率。

Figure 5 The effect of *BcHK91* knockout on spore germination rate and appressorium formation rate in *Botrytis cinerea*. A: Spore germination rate of each strain at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h; B: Appressoria formation rate of each strain at 8, 10, 12, 24, 48 h. **: $P < 0.01$.

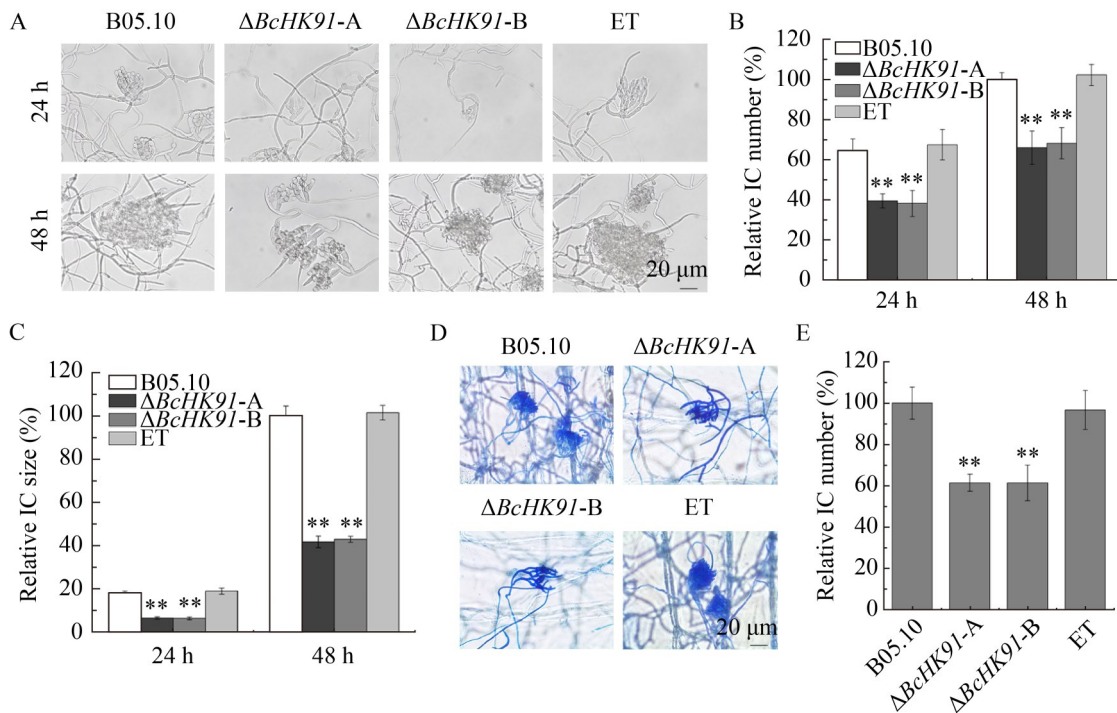


图6 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌侵染垫形成的影响。A: 载玻片上24 h和48 h侵染垫的形成情况; B: 载玻片上产生侵染垫的相对数量; C: 载玻片上产生侵染垫的相对面积; D: 洋葱表皮上30 h侵染垫的形成情况; E: 洋葱表皮上产生侵染垫的相对数量。

Figure 6 The effect of *BcHK91* knockout on infection cushion formation in *Botrytis cinerea*. A: Formation of infection cushions at 24 h and 48 h on slides; B: Quantification of the numbers of infection cushions produced by the indicated strains on an inductive surface; C: Quantification of the sizes of infection cushions produced by the indicated strains on an inductive surface; D: Formation of infection cushions at 30 h on the onion epidermis; E: Relative number of infection cushions. **: $P < 0.01$.

$\Delta BcHK91-A$ 、 $\Delta BcHK91-B$ 和 ET 菌株分别接种在添加了细胞壁胁迫因子刚果红和细胞膜胁迫因子 SDS 的完全培养基平板上, 并统计生长 3 d 的菌丝直径。结果显示, 相较于 B05.10 和 ET 菌株, $\Delta BcHK91-A$ 和 $\Delta BcHK91-B$ 对刚果红和 SDS 的敏感性均显著上升(图 8A–8C)。这表明 *BcHK91* 基因参与维持灰霉病菌细胞壁和细胞膜的完整性。

2.9 *BcHK91* 基因敲除后灰霉病菌的基因差异表达分析

为探究 *BcHK91* 调控的基因表达谱, 利用 RNA-seq 技术对 B05.10 和 $\Delta BcHK91-A$ 菌株进

行转录组分析。对 DEGs 进行分析发现, 与野生型相比 $\Delta BcHK91-A$ 突变体中有 1 533 个差异表达基因, 其中 1 017 个基因上调, 516 个基因下调(\log_2 fold change=2, FDR<0.01)(图 9A)。为进一步揭示这些基因的功能特性, 进行了基因本体(GO)富集分析。GO 分析将差异表达基因分为三大类: 生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)。分子功能主要集中在催化活性(catalytic activity)、蛋白质结合(binding)和转运活性(transporter activity); 细胞组成主要分布在细胞结构体(cellular anatomical entity)和细胞内(intracellular); 生物过程中, 细胞过程(cell

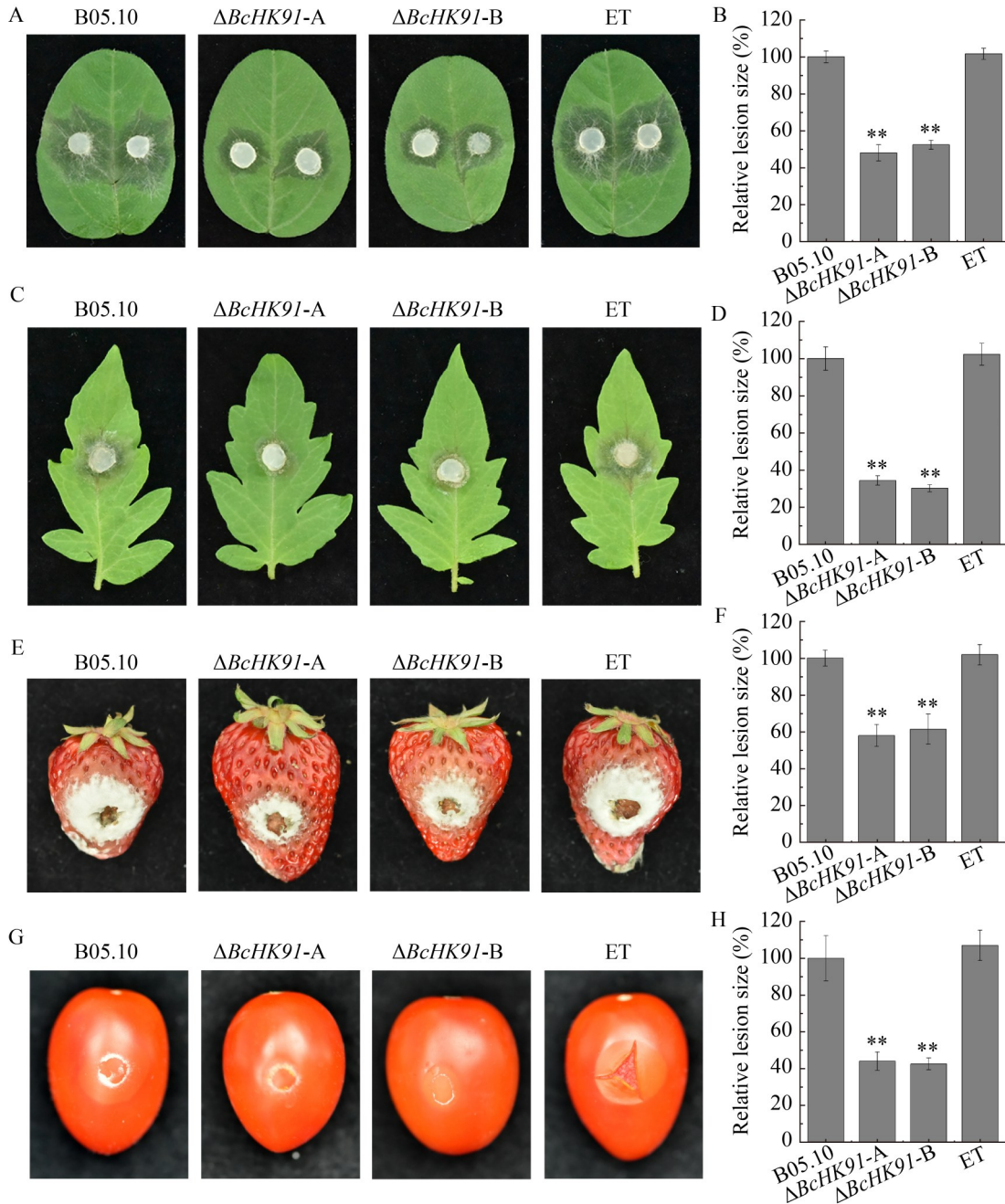


图7 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌致病性的影响。A、C、E、G: 大豆叶片、番茄叶片、草莓果实与番茄果实的致病结果; B、D、F、H: 接种3 d后在大豆叶片、番茄叶片、草莓果实与番茄果实上形成病斑的相对大小。

Figure 7 The effect of *BcHK91* knockout on pathogenicity of *Botrytis cinerea*. A: Size of lesions formed by the indicated strains on soybean leaves; B: Quantification of the lesion sizes caused by the indicated strains on soybean leaves at 3 d post-inoculation; C: Size of lesions formed by the indicated strains on tomato leaves; D: Quantification of the lesion sizes caused by the indicated strains on tomato leaves at 3 d post-inoculation; E: Size of lesions formed by the indicated strains on strawberries; F: Quantification of the lesion sizes caused by the indicated strains on strawberries at 3 d post-inoculation; G: Size of lesions formed by the indicated strains on tomatoes; H: Quantification of the lesion sizes caused by the indicated strains on tomatoes at 3 d post-inoculation. **: $P < 0.01$.

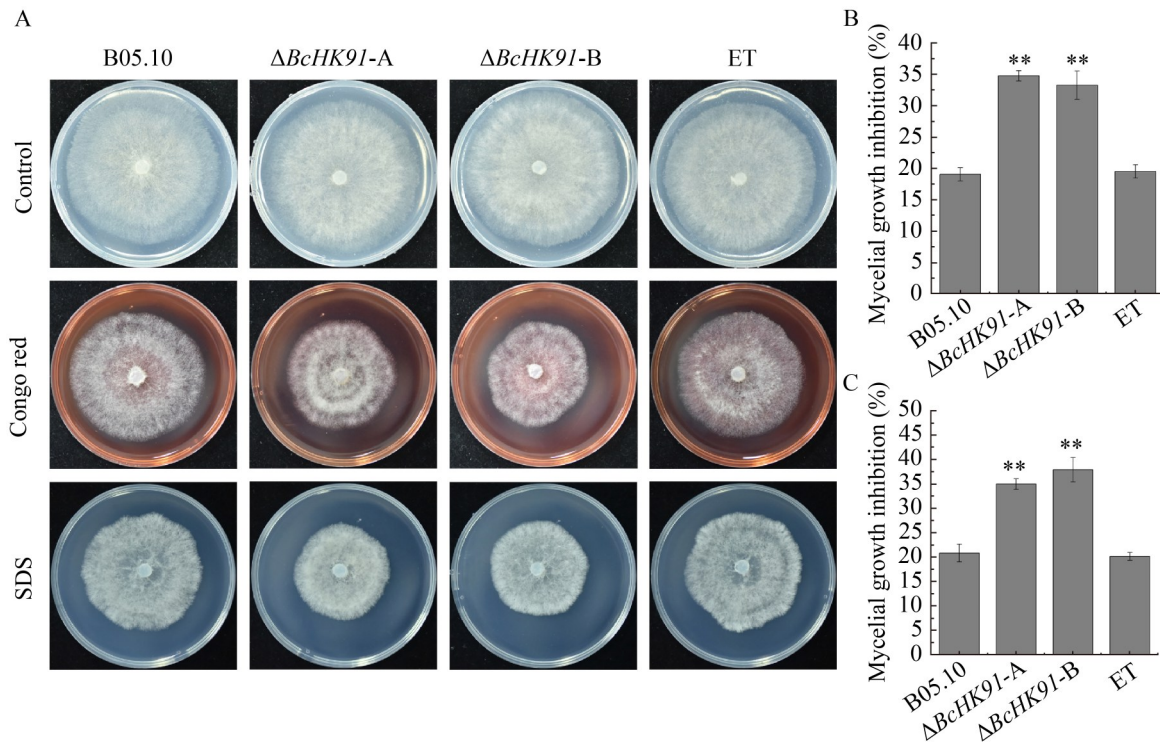


图8 *BcHK91*的敲除对灰霉病菌细胞壁和细胞膜胁迫因子敏感性的影响。A: 在CM平板上培养3 d后观察各菌株对刚果红和SDS的耐受性; B: 各菌株在添加了细胞壁胁迫因子刚果红平板上的生长抑制率; C: 各菌株在添加了细胞膜胁迫因子SDS平板上的生长抑制率。

Figure 8 Effect of *BcHK91* knockout on susceptibility to cell wall- and membrane-targeting stress agents in *Botrytis cinerea*. A: The tolerance of the indicated strains to Congo red and SDS was observed after 3 d of cultivation on CM plate; B: Inhibition of strain growth on plates supplemented with the cell wall stress factor Congo red; C: Inhibition of strain growth on plates supplemented with the cell membrane stress factor SDS. **: $P < 0.01$.

process)与代谢过程(metabolic process)功能类型的DEGs差异较大,这类生物过程的DEGs可能与灰霉病菌*BcHK91*敲除后致病能力下降有关(图9B)。

KEGG 通路富集分析显示, DEGs 分布于 50 个通路。其中, 细胞过程 (cellular processes) 中的减数分裂 (meiosis) 与过氧化物酶体 (peroxisome)、环境应答过程 (environmental information processing) 中的 ABC 转运受体 (ABC transporters) 与 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、遗传过程 (genetic information processing) 中的内质网蛋白合成过程 (protein

processing in endoplasmic reticulum) 以及代谢 (metabolism) 过程中的淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)、戊糖和葡萄糖酸的相互转换 (pentose and glucuronate interconversions)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism) 富集的 DEGs 最多 (图 9C)。其中, *BcHK91* 敲除对代谢通路的影响最大, DEGs 数量占总通路数量的 70.9%, 尤其是碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 与氨基酸代谢 (amino acid metabolism), 分别占代谢过程中 DEGs 数量的 35.7% 与 25.0%。推测这些通路的关键差异基因参与调控灰霉病菌 B05.10 的生理

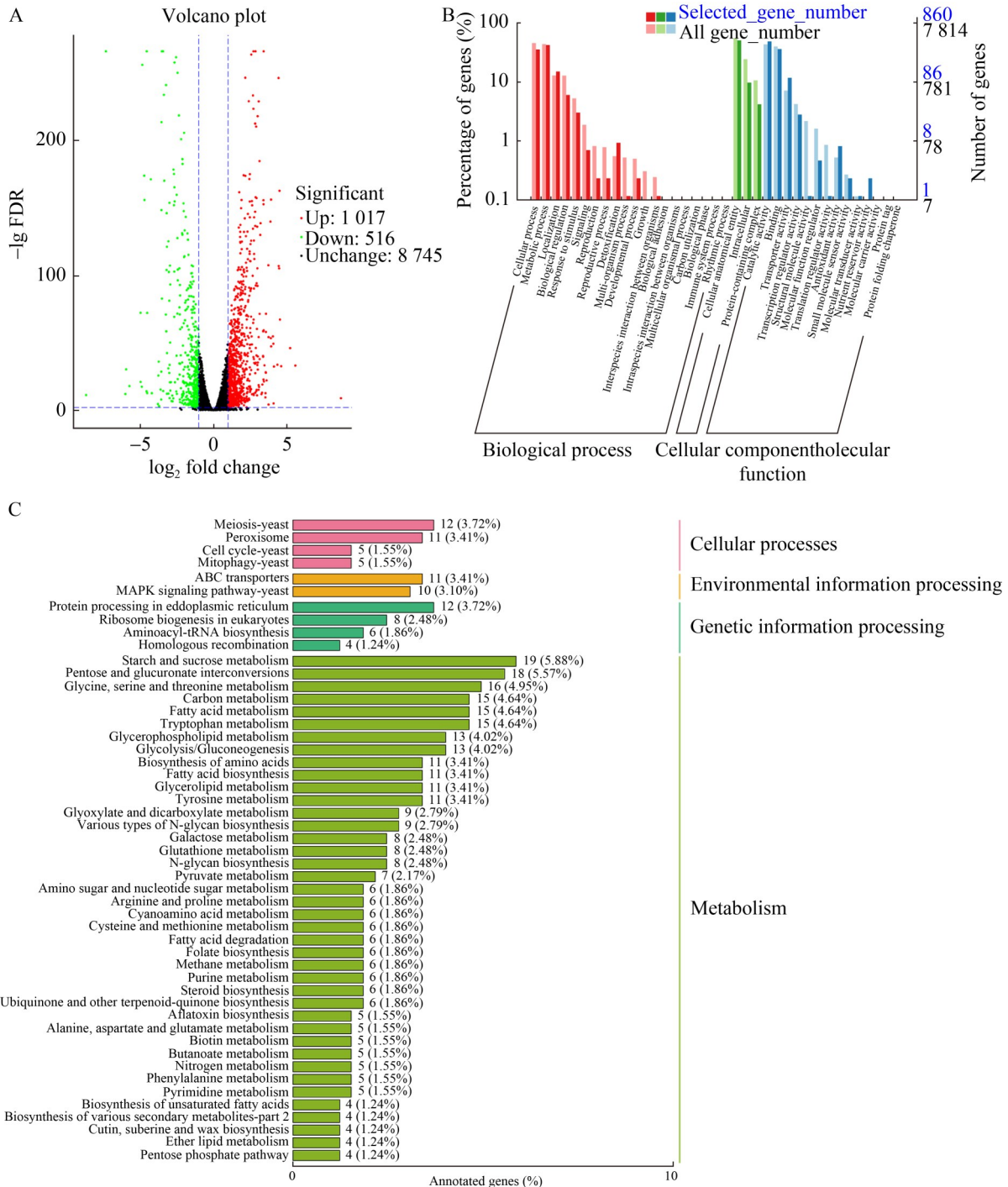


图9 *BcHK91*基因敲除后灰霉病菌基因差异表达分析。A: *BcHK91*敲除突变体的转录组分析; B: 基因本体(gene ontology, GO)富集分析; C: KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析。

Figure 9 Analysis of *Botrytis cinerea* gene differential expression after *BcHK91* gene knockout. A: Transcriptome analysis of *BcHK91* knockout mutant; B: gene ontology (GO) enrichment analysis; C: KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) enrichment analysis.

特性和致病性。在上述富集程度较高的通路中发现已知 5 个重要基因, 其中 *Bchex5* 参与碳水化合物代谢, 与细胞膜和细胞壁的完整性有关; 过氧化氢酶基因 *Bccat4* 与 MAPK 级联反应有关, 参与调控外界胁迫; *Bcerg5*、*Bcnrps7*、*Bclcc9* 参与次生代谢物质的合成、转运与代谢以及防御机制, 调控黑色素的合成。

2.10 与生理特性和致病相关基因

通过 *in silico* 分析差异表达基因的功能, 如表 2 所示, 差异表达基因中有 17 个已知功能基因, 分别参与调控真菌的营养生长、黑色素的

形成、菌核形成、氧化应激反应、细胞壁合成、细胞膜完整性和致病性等功能。这些基因在 *BcHK91* 敲除后均有不同程度的上调及下调表达, 表明 *BcHK91* 敲除后的表型与致病性变化可能与这些基因有关。

2.11 qPCR 验证

随机选取上述 9 个基因以及 4 个假想蛋白的编码基因进行 qPCR 验证。如图 10 所示, 这 13 个基因 qPCR 的表达水平与转录组测序获得的数据趋势一致, 说明该转录组的可信度较高。

表2 响应*BcHK91*敲除后生理表型变化及致病性的相关基因

Table 2 Genes related to the response of *BcHK91* knockout to physiological phenotypic changes and pathogenicity

Accession number	Gene name	Main function	Expression fold change (log ₂ fold change)	Regulation	Reference
BCIN_15g05270	<i>Bcpie2</i>	Cell membrane integrity	4.49	Up-regulated	[22]
BCIN_01g01450	<i>BcatrO</i>	Cell membrane integrity, oxidative stress response	4.37	Up-regulated	[23]
BCIN_16g00450	<i>Bcswf1</i>	Cell membrane integrity	2.38	Up-regulated	[24]
BCIN_07g06780	<i>Bclcc9</i>	melanin biosynthesis	-2.09	Down-regulated	[25]
BCIN_15g03440	<i>BcCHS7</i>	Hyphal growth, sexual reproduction, pathogenicity	-1.16	Down-regulated	[26]
BCIN_03g08050	<i>Bcpls13</i>	Melanin synthesis, vegetative growth and virulence	-3.23	Down-regulated	[27]
BCIN_04g04800	<i>Bcbrn1</i>	Melanin biosynthesis and virulence	-2.73	Down-regulated	[28]
BCIN_07g01120	<i>Bcerg5</i>	Melanin synthesis and defense response, cell membrane integrity	1.29	Up-regulated	[29]
BCIN_02g08760	<i>Bcsmr1</i>	Melanin synthesis, sclerotial development	1.81	Up-regulated	[30]
BCIN_03g08110	<i>Bcscd1</i>	Melanin synthesis, sclerotial development, cell wall integrity	-1.48	Down-regulated	[31]
BCIN_06g00510	<i>Bhp3</i>	Sclerotial development	-3.61	Down-regulated	[32]
BCIN_05g00730	<i>Bccat4</i>	Oxidative stress response	1.89	Up-regulated	[33]
BCIN_06g01180	<i>BccatA</i>	Oxidative stress response	1.30	Up-regulated	[34]
BCIN_09g04550	<i>Bcswel</i>	MAPK cascade signaling	1.41	Up-regulated	[35]
BCIN_02g03050	<i>Bcsln1</i>	Hyphal growth, conidiation, sexual reproduction, osmotic stress response, pathogenicity	-1.38	Down-regulated	[13]
BCIN_03g01490	<i>Bclgal</i>	Pathogenicity, virulence	-2.96	Down-regulated	[36]
BCIN_15g02380	<i>Bcacpl</i>	cell wall-degrading enzymes, pathogenicity	2.74	Up-regulated	[37]

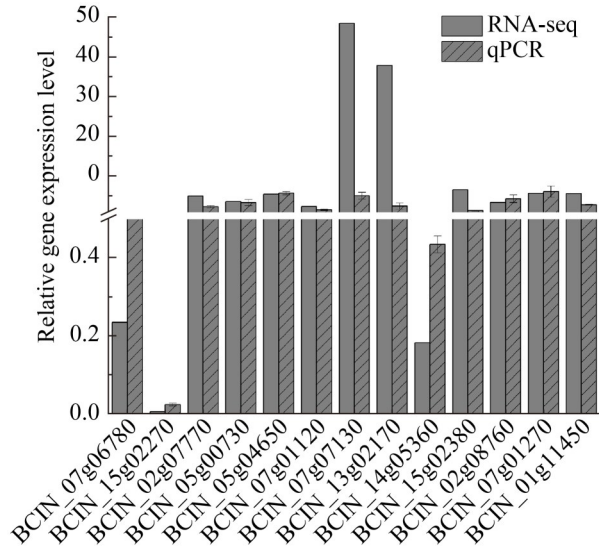


图10 13个基因的qPCR分析与转录组数据的对比
Figure 10 qPCR analysis of expression levels of 13 genes in $\Delta BcHK91$ and verification of RNA-seq data.

3 讨论与结论

真菌通过普遍存在且进化保守的 MAPK 激酶信号通路感知和响应各种变化的信号。双组分磷酸化系统是普遍存在于 MAPKKK-MAPKK-MAPK 途径的上游因子^[10]。本研究对灰霉病菌双组分系统中 XI 型 HKs 基因 *BcHK91* 进行了功能分析。通过对 *BcHK91* 基因敲除突变体的功能进行分析发现, 该基因敲除后影响了菌核的形成、孢子产量、孢子萌发率以及侵染结构的形成。此外, *BcHK91* 还参与细胞壁和细胞膜完整性及致病性等方面的调控。

BcHK91 为 XI 型 HKs, 在结构上相比目前已研究的灰霉病菌 III 型和 VI 型的 HKs 基因多一个 PAS 结构域^[6]。PAS 结构域是广泛的信号结构域家族的一部分, 可能参与辅助因子结合和蛋白质间的相互作用^[18]。在酿酒酵母中 *SLN1* 是唯一的 HKs 基因, 该基因敲除会导致菌体死亡^[6,19]。然而在灰霉病菌中 *BcHK91* 基因缺失不会导致灰霉病菌致死, 推测可能是因为灰霉病菌中的 20 多个 HKs 基因在结构和功能上存在交

叉冗余。

在灰霉病菌中敲除 *BcHK91* 后虽然不影响菌株的生长速率, 但不能形成菌核。菌核是灰霉病菌在不利环境中生存和传播的重要结构, 菌核的形成与真菌的生存策略密切相关, 缺失该基因可能使真菌在环境压力下的生存能力下降^[38]。本研究还发现, *BcHK71* 敲除后菌株分生孢子产量明显下降, 而已研究的粗糙脉胞霉中 XI 型 HKs 基因 *DCC-1* 敲除后孢子产量增加, 说明 XI 型 HKs 对真菌产孢的影响存在差异^[18]。此外, 本研究发现突变体和野生型的孢子大小存在差异, 表明 *BcHK91* 在灰霉病菌中可能起着维持孢子形态的作用。孢子是灰霉病菌传播和感染的主要方式, 孢子产量的减少直接影响到其致病性。转录组实验表明, 突变体 $\Delta BcHK91$ 中 *Bcscd1*、*Bcbhp3* 与 *Bcsln1* 的基因表达水平均下降, 且这 3 个基因分别参与调控菌核的形成与分生孢子的形成^[13,31-32]。这些结果说明 *BcHK91* 可能通过调控与灰霉病菌有性生殖有关的基因来影响 B05.10 的致病性。此外, *Bclcc9*、*Bcpgk13*、*Bcbrn1*、*Bcerg5*、*Bcsmr1*、*Bcscd* 与 *Bcsln1* 还调控真菌黑色素的产生, 其表达量均有变化, 有关 *BcHK91* 对黑色素的影响还需要进一步分析。

BcHK91 基因缺失还导致孢子萌发率和附着胞形成率降低, 影响了真菌对宿主植物的侵染能力。侵染垫是灰霉病菌孢子侵入宿主植物的重要结构, *BcHK91* 基因的缺失导致侵染垫在不同介质上均发育延缓, 进一步降低了其致病性。从致病性结果来看, *BcHK91* 基因缺失突变体的致病力有所下降但未完全丧失。类似地, 在小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)中 *Fhk1* 与白色念珠菌(*Candida albicans*)中 *Cph1* 基因的缺失均会降低病原菌的致病性^[39-40]。上述结果表明这些 HKs 基因在致病机制中均发挥着重要作用。

许多 HKs 基因在信号转导中发挥重要作用, 调控细胞对环境压力的应答^[5]。*BcHK91* 的缺失使得突变体对细胞壁和细胞膜胁迫因子的敏感

性上升, 这与其他真菌中 HKs 基因的功能相似。例如, *NIK1* 在粗糙脉胞霉中的缺失会影响其对环境压力的适应能力^[14], 表明 HKs 基因在真菌应对环境胁迫中发挥着重要作用。本研究还发现, 突变体 $\Delta BcHK91$ 中 *Bcpie2*、*BcatrO*、*Bcswf1* 与 *Bcscd1* 的表达量发生了改变, 而这几个基因分别通过控制质膜胆碱转运蛋白、外排转运蛋白以及跨膜蛋白修饰与维持细胞壁的完整性来调控细胞膜与细胞壁^[22-24,31], 推测 *BcHK91* 可能通过 *Bcscd1*、*Bcacp1*、*Bcpie2*、*BcatrO*、*Bcscd1* 来调节灰霉病菌细胞膜和细胞壁的合成。

综上所述, HKs 基因 *BcHK91* 在灰霉病菌的生长、发育及致病性中发挥着重要作用。其缺失导致菌核和孢子产生减少、侵染垫形成率下降以及对细胞壁和细胞膜胁迫因子的敏感性增加。通过与其他真菌 HKs 基因的比较可以更深入地理解 *BcHK91* 的功能及其在真菌生物学中的重要性。这些研究为开发新的植物病害防治策略提供了理论基础, 未来的研究可以进一步探讨 *BcHK91* 在信号转导和植物免疫中的具体机制。

作者贡献声明

金珂宇: 数据收集及分析、验证, 完成呈现, 撰写文章; 王梦晶: 方法论, 数据分析, 验证, 完成呈现, 撰写文章; 沈诗焱: 数据收集及分析; 武婧雨: 验证, 撰写; 李岳谦: 数据收集; 郭俭: 编辑、审阅; 王教瑜: 提供资源, 审阅; 李玲: 提出概念, 获取基金, 项目管理, 提供资源。

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] DEAN R, van KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, Di PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J,

FOSTER GD. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414-430.

[2] 杨亚兰. 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)中与咯菌腈作用机理相关基因 *BcSln1* 和 *BcSho1* 的生物学功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.

YANG YL. Biological function of the two genes, *BcSln1* and *BcSho1*, related to mode of action about fludioxonil in *Botrytis cinerea*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).

[3] CAPRA EJ, LAUB MT. Evolution of two-component signal transduction systems[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 325-347.

[4] IKNER A, SHIOZAKI K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, 569(1/2): 13-27.

[5] APPLEBY JL, PARKINSON JS, BOURRET RB. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled[J]. *Cell*, 1996, 86(6): 845-848.

[6] CATLETT NL, YODER OC, TURGEON BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens[J]. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2(6): 1151-1161.

[7] WURGLER-MURPHY SM, SAITO H. Two-component signal transducers and MAPK cascades[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(5): 172-176.

[8] MASCHER T, HELMANN JD, UNDEN G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 910-938.

[9] RISPAIL N, SOANES DM, ANT C, CZAJKOWSKI R, GRÜNLER A, HUGUET R, PEREZ-NADALES E, POLI A, SARTOREL E, VALIANTE V, YANG M, BEFFA R, BRAKHAGE AA, GOW NAR, KAHMANN R, LEBRUN MH, LENASI H, PEREZ-MARTIN J, TALBOT NJ, WENDLAND J, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signalling components in plant and human pathogenic fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(4): 287-298.

[10] POSAS F, WURGLER-MURPHY SM, MAEDA T, WITTEN EA, THAI TC, SAITO H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor[J]. *Cell*, 1996, 86(6): 865-875.

[11] ZHANG HF, LIU KY, ZHANG X, SONG WW, ZHAO Q, DONG YH, GUO M, ZHENG XB, ZHANG ZG. A two-component histidine kinase, MoSLN1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. *Current Genetics*, 2010, 56(6): 517-528.

[12] PEREZ-NADALES E, di PIETRO A. The transmembrane protein Sho1 cooperates with the mucin Msb2 to regulate invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant Pathology*,

- 2015, 16(6): 593-603.
- [13] REN WC, LIU N, YANG YL, YANG QQ, CHEN CJ, GAO QL. The sensor proteins BcSho1 and BcSln1 are involved in, though not essential to, vegetative differentiation, pathogenicity and osmotic stress tolerance in *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 328.
- [14] OCHIAI N, FUJIMURA M, MOTOYAMA T, ICHIISHI A, USAMI R, HORIKOSHI K, YAMAGUCHI I. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the Os-1 mutants of *Neurospora crassa*[J]. *Pest Management Science*, 2001, 57(5): 437-442.
- [15] AVENOT H, SIMONEAU P, IACOMI-VASILESCU B, BATAILLÉ-SIMONEAU N. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance[J]. *Current Genetics*, 2005, 47(4): 234-243.
- [16] DONGO A, BATAILLÉ-SIMONEAU N, CAMPION C, GUILLEMETTE T, HAMON B, IACOMI-VASILESCU B, KATZ L, SIMONEAU P. The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 127-134.
- [17] YIN XR, LI PF, WANG ZW, WANG J, FANG AF, TIAN BN, YANG YH, YU Y, BI CW. Binding mode and molecular mechanism of the two-component histidine kinase Bos1 of *Botrytis cinerea* to fludioxonil and iprodione[J]. *Phytopathology*, 2024, 114(4): 770-779.
- [18] BARBA-OSTRIA C, LLEDÍAS F, GEORGELLIS D. The *Neurospora crassa* DCC-1 protein, a putative histidine kinase, is required for normal sexual and asexual development and carotenogenesis[J]. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(12): 1733-1739.
- [19] 冯青凤. 稻瘟病菌中双组分组氨酸激酶基因 *MoHik2* 和 *MoHik3* 的功能研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
FENG QF. Functional study of two-component histidine kinase genes *MoHik2* and *MoHik3* from *Magnaporthe oryzae*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [20] REN WC, LIU N, SANG CW, SHI DY, ZHOU MG, CHEN CJ, QIN QM, CHEN WC. The autophagy gene *BcATG8* regulates the vegetative differentiation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(11): e02455-17.
- [21] WANG H, HWANG SF, CHANG KF, TURNBULL GD, HOWARD RJ. Characterization of *Ascochyta* isolates and susceptibility of pea cultivars to the *Ascochyta* disease complex in Alberta[J]. *Plant Pathology*, 2000, 49(5): 540-545.
- [22] ZHANG H, JI HL, LIU CY. Antifungal metabolites of biocontrol strain LB-1 and their inhibition mechanism against *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1444996.
- [23] LIU M, PENG JB, WANG XC, ZHANG W, ZHOU Y, WANG H, LI XH, YAN JY, DUAN LS. Transcriptomic analysis of resistant and wild-type *Botrytis cinerea* isolates revealed fludioxonil-resistance mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 988.
- [24] GONZÁLEZ MONTORO A, QUIROGA R, MACCIONI HJF, VALDEZ TAUBAS J. A novel motif at the C-terminus of palmitoyltransferases is essential for Swf1 and Pfa3 function *in vivo*[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 419(2): 301-308.
- [25] LI H, SHEN XM, WU WJ, ZHANG WY, WANG YS. Ras2 is responsible for the environmental responses, melanin metabolism, and virulence of *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(4): 432.
- [26] CUI ZF, WANG YH, LEI N, WANG K, ZHU TH. *Botrytis cinerea* chitin synthase BcChsVI is required for normal growth and pathogenicity[J]. *Current Genetics*, 2013, 59(3): 119-128.
- [27] ZHANG CH, HE YF, ZHU PK, CHEN L, WANG YW, NI B, XU L. Loss of bcbn1 and bcpks13 in *Botrytis cinerea* not only blocks melanization but also increases vegetative growth and virulence[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(10): 1091-1101.
- [28] ZHANG HH, LI YR, DICKMAN MB, WANG ZH. Cytoprotective co-chaperone BcBAG1 is a component for fungal development, virulence, and unfolded protein response (UPR) of *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 685.
- [29] YUAN XJ, YANG FG, WANG YM, LI SX, ZHANG DM, LIANG WX, YANG QQ. Scopoletin negatively regulates the HOG pathway and exerts antifungal activity against *Botrytis cinerea* by interfering with infection structures, cell wall, and cell membrane formation[J]. *Phytopathology Research*, 2024, 6(1): 1.
- [30] ZHOU YJ, YANG L, WU MD, CHEN WD, LI GQ, ZHANG J. A single-nucleotide deletion in the transcription factor gene *bcsmr1* causes sclerotial-melanogenesis deficiency in *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2492.
- [31] ZHOU YJ, SONG JJ, WANG YC, YANG L, WU MD, LI GQ, ZHANG J. Biological characterization of the melanin biosynthesis gene *Bcscd1* in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2022, 160: 103693.
- [32] TERHEM RB, HAHN M, van KANJAL. The role of hydrophobins in sexual development of *Botrytis cinerea*[C]. In 27th Fungal Genetics Conference, 2013: 148. DOI: 10.4148/1941-4765.1008.
- [33] MIAO ZG, WANG GY, SHEN H, WANG X, GABRIEL DW, LIANG WX. BcMett14-mediated DNA adenine N⁶-methylation is critical for virulence of *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 925868.
- [34] FAN L, WEI YY, CHEN Y, OUAZIZ M, JIANG S, XU F, WANG HF, SHAO XF. Transcriptome analysis reveals

- the mechanism of antifungal peptide epinecidin-1 against *Botrytis cinerea* by mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2024, 202: 105932.
- [35] LIU H, WANG YC. The function and regulation of budding yeast Swel in response to interrupted DNA synthesis[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(6): 2746-2756.
- [36] ZHANG L, STASSEN JHM, CHATTERJEE S, CORNELISSEN M, VAN KANJAL. The regulation of D-galacturonic acid utilization in *Botrytis cinerea*[C]. 27th Fungal Genetics Conference, Asilomar, Pacific Grove, California, USA, 2013: 12-17. DOI: 10.4148/1941-4765.1008.
- [37] ROLLAND S, BRUEL C, RASCLE C, GIRARD V, BILLON-GRAND G, POUSSEREAU N. pH controls both transcription and post-translational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 6): 2097-2105.
- [38] CHEUNG J, HENDRICKSON WA. Sensor domains of two-component regulatory systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 116-123.
- [39] RISPAIL N, Di PIETRO A. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(3): 395-407.
- [40] RAMÍREZ-ZAVALA B, WEYLER M, GILDOR T, SCHMAUCH C, KORNITZER D, ARKOWITZ R, MORSCHHÄUSER J. Activation of the Cph1-dependent MAP kinase signaling pathway induces white-opaque switching in *Candida albicans*[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): E1003696.