

灰葡萄孢 TetR 家族转录因子 BcPDR1 的关键氨基酸位点分析

曲德轩^{1,2#}, 刘晓颖^{1,2#}, 魏雅迪¹, 藏金萍¹, 曹宏哲¹, 张康^{1,2}, 邢继红^{1,2*}, 董金皋^{1,2*}

1 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北 保定

2 华北作物改良与调控国家重点实验室, 河北 保定

曲德轩, 刘晓颖, 魏雅迪, 藏金萍, 曹宏哲, 张康, 邢继红, 董金皋. 灰葡萄孢 TetR 家族转录因子 BcPDR1 的关键氨基酸位点分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1107-1118.

QU Dexuan, LIU Xiaoying, WEI Yadi, ZANG Jinping, CAO Hongzhe, ZHANG Kang, XING Jihong, DONG Jingao. Key amino acid sites of the TetR family transcription factor BcPDR1 in *Botrytis cinerea*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1107-1118.

摘要:【目的】明确灰葡萄孢 TetR 家族转录因子 BcPDR1 的关键氨基酸位点, 为阐明 BcPDR1 调控病菌生长发育及致病力的机制奠定基础。【方法】运用生物信息学手段分析 BcPDR1 蛋白的关键氨基酸位点, 选取 4 个保守区域(32-34、76-95、140-150 和 189 位氨基酸)进行定点突变。在敲除突变体 $\Delta BcPDR1$ 的基础上, 构建 *BcPDR1-M1* ($\Delta 32-34$)、*BcPDR1-M2* ($\Delta 76-95$)、*BcPDR1-M3* ($\Delta 140-150$)和 *BcPDR1-M4* (将 189 位 Ile 突变为 Lys)突变体。对上述 4 个突变体与灰葡萄孢野生型菌株、 $\Delta BcPDR1$ 以及互补菌株 CE 进行表型和致病力的对比分析。【结果】突变体 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 的菌落形态、菌丝形态和生长速率与 $\Delta BcPDR1$ 相似, 而与野生型 BC22 和互补菌株 CE 存在显著差异; 各突变体均能在番茄果实和烟叶上形成病斑, 但病斑面积显著小于野生型 BC22 和互补菌株 CE。【结论】灰葡萄孢 TetR 家族转录因子 BcPDR1 的 32-34、76-95、140-150 位区域及 189 位氨基酸为其发挥功能的关键调控位点。

关键词: 灰葡萄孢; BcPDR1; 关键氨基酸位点; 生长和发育; 致病力

资助项目: 国家自然科学基金(32072369); 中央引导地方科技发展资金(246Z6506G)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072369) and the Central Guidance for Local Technology Development Funding (246Z6506G).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XING Jihong, xingjihong2000@126.com; DONG Jingao, dongjingao@126.com

Received: 2025-09-16; Accepted: 2025-10-28; Published online: 2025-11-18

Key amino acid sites of the TetR family transcription factor BcPDR1 in *Botrytis cinerea*

QU Dexuan^{1,2#}, LIU Xiaoying^{1,2#}, WEI Yadi¹, ZANG Jinping¹, CAO Hongzhe¹, ZHANG Kang^{1,2}, XING Jihong^{1,2*}, DONG Jingao^{1,2*}

1 Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Baoding, Hebei, China

2 State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation, Baoding, Hebei, China

Abstract: [Objective] To identify the key amino acid residues of the TetR family transcription factor BcPDR1 in *Botrytis cinerea*, thereby laying a foundation for elucidating the mechanism by which BcPDR1 regulates the growth, development, and pathogenicity of this pathogen. **[Methods]** The key amino acid sites of BcPDR1 were analyzed by bioinformatics methods, and four conserved regions (32–34 aa, 76–95 aa, 140–150 aa, and 189 aa) were selected for site-directed mutagenesis. On the basis of the knockout mutant $\Delta Bcprd1$, the mutants *BcPDR1-M1* ($\Delta 32-34$), *BcPDR1-M2* ($\Delta 76-95$), *BcPDR1-M3* ($\Delta 140-150$), and *BcPDR1-M4* (mutation of Ile to Lys at 189 aa) were constructed. A comparative analysis of the phenotypic characteristics and pathogenicity was conducted on the four aforementioned mutants and the wild-type strain of *B. cinerea*, $\Delta Bcprd1$, the complemented strain CE. **[Results]** The colony morphology, mycelial morphology, and growth rates of *BcPDR1-M1*, *BcPDR1-M2*, *BcPDR1-M3*, and *BcPDR1-M4* were similar to those of $\Delta Bcprd1$, but significantly different from those of BC22 and CE. These mutants could form lesions on tomato fruits and tobacco leaves, while their lesion areas were significantly smaller than those of BC22 and CE. **[Conclusion]** The regions 32–34, 76–95, 140–150, and the 189th amino acid are the regulatory sites for BcPDR1 to exert its functions.

Keywords: *Botrytis cinerea*; BcPDR1; key amino acid sites; growth and development; pathogenicity

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)作为一种典型的死体营养型植物病原真菌, 凭借其广泛的寄主范围和复杂的侵染策略, 已成为全球农业经济中危害最为严重的病原真菌之一^[1-2]。该菌可侵染葡萄、番茄、黄瓜、辣椒等多种经济作物, 通过分泌果胶酶、纤维素酶等胞壁降解酶以及毒素类物质, 在宿主植物组织中高效定殖与扩展, 进而引发具有毁灭性的灰霉病, 每年造成全球超百亿美元的经济损失^[3]。相关研究表明, 灰葡萄孢的侵染过程涉及菌丝穿透、分生孢子萌发、菌核形成等多形态转化机制, 且需要精

准调控次生代谢酶系及毒素合成基因网络^[4-5]。因此, 系统解析与灰葡萄孢生长发育及致病相关的关键基因功能不仅是揭示其致病分子机理的核心途径, 还能为植物病原真菌的通用研究提供创新性研究范式, 具有重大的科学价值。

TetR 家族转录因子 (TetR family transcriptional regulator, TFRs) 在细菌中是一类高度保守的调控枢纽, 在生理代谢、抗生素合成、群体感应以及致病抗药性调控等关键生物过程中发挥核心作用, 已成为抗感染药物研发的重要靶标^[6-8]。例如, 在微白黄链霉菌 (*Streptomyces*

albidoﬂavus)中, TetR 调节因子 SCO3201 通过抑制放线菌素的合成与形态分化对次级代谢过程产生影响^[9]; 在谷氨酸棒状杆菌(*Streptomyces avermitilis*)中, 高度保守的 TFR-FasR 作为阻遏蛋白能够精细调控脂肪酸的合成过程^[10]; 在分枝杆菌属(*Mycobacterium*)中, TetR 家族阻遏蛋白 BkaR (也称 Fad35R)通过特异性结合靶基因上游的回文基序, 抑制自身以及参与支链酮酸代谢基因簇的转录^[11]; 此外, TetR 家族转录调节因子 SP_2854 能够正向调节丁烯基-spinosyn 的生物合成, 同时影响菌株的生长、葡萄糖消耗以及菌丝形态^[12]。截至目前, 植物病原真菌中 TetR 家族成员的鉴定及功能研究仍处于空白状态, 其在真菌特异性生理过程中的作用机制也尚未被揭示。

在本实验室的前期研究中获得了一个与灰葡萄孢致病相关的新基因 *BcPDR1*。通过基因敲除与互补技术, 证实该基因能够正向调控病菌的生长发育以及致病力, 这提示其有望作为灰霉病防治药物筛选的新靶标。序列比对结果显示, *BcPDR1* 与 TetR 家族典型成员 SmcR [蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB)登录号 3KZ9]、HapR (PDB 登录号 2PBX)的序列一致性分别为 21% 和 29%, 但其空间结构均含多个 α -螺旋, 这与 TetR 家族“低序列同源性但高结构保守性”的特征高度相符。为了验证 *BcPDR1* 的家族归属并深入解析其功能机制, 本研究采用生物信息学方法, 对 *BcPDR1* 与 TetR 家族的关键氨基酸序列进行对比分析, 选取保守区域进行定点突变, 并在敲除突变体 $\Delta Bcptr1$ 的基础上构建位点突变菌株。通过系统分析突变体的表型及致病力变化, 明确 *BcPDR1* 的关键功能位点。本研究不仅为植物病原真菌 TetR 家族转录因子的功能与分子机制研究奠定基础, 更提供了新型杀菌剂分子设计的新靶标, 对灰霉病等植物病害防治具有重要理论价值与实践意义。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和载体

灰葡萄孢 BC22 野生型菌株、*BcPDR1* 基因敲除突变体 $\Delta Bcptr1$ 以及互补菌株 CE, pCR8 克隆载体、pEarleyGate-103 表达载体、农杆菌 GV3101, 均由河北省植物生理与分子病理学重点实验室保存并提供。

1.2 *BcPDR1* 蛋白关键位点突变设计与载体构建

利用 ClustalW 2 软件(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对 *BcPDR1* 蛋白及其同源蛋白的氨基酸序列进行比对, 选择 4 个相对保守位点进行定点突变设计。其中, *BcPDR1-M1* 敲除 32–34 位氨基酸, *BcPDR1-M2* 敲除 76–95 位氨基酸, *BcPDR1-M3* 敲除 140–150 位氨基酸, *BcPDR1-M4* 将 189 位 Ile 突变为 Lys。依据基因定点突变原理设计基因定点突变的引物(表 1)。按照 TRIzol (总 RNA 提取试剂, 北京博迈德基因技术有限公司)及反转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书, 提取灰葡萄孢野生型 BC22 的总 RNA, 并反转录合成其 cDNA。利用基因特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Super Pfx Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。电泳检测后, 将其与 pCR8 克隆载体连接, 对阳性克隆进行测序鉴定。将测序正确的定点突变基因与终载体 pEarleyGate-103 连接, 经测序验证后, 最终完成 *BcPDR1* 蛋白保守位点突变的载体构建。

1.3 突变体的构建与鉴定

利用根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)技术将构建成功的载体分别转化到 $\Delta Bcptr1$ 中, 经筛选获得阳性转化子。采用 CTAB 法提取转化

表1 载体构建和RT-qPCR的引物设计

Table 1 Primers design of vector construction and RT-qPCR

基因名 Gene names	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>BcPDR1</i>	BcPDR1-F	ATGGCTGAGAGGTTACCGACTG
	BcPDR1-R	TTCACGACGAATACTCGAATGG
<i>BcPDR-M1</i>	BcPDR1-M1-F	GATAAAAAGCTGAAAAAAGCAAAACGCAAACCTCAG
	BcPDR1-M1-R	CTCCGATTTCCGGTTCTGAGTTTTCGTTTTGCTTT
<i>BcPDR1-M2</i>	BcPDR1-M2-F	CAAACCCGTGAATCATTGATGTACTTTGCATCACA
	BcPDR1-M2-R	GGCTTCGTTCTAATCCTCCGTAATAATGTGATGCA
<i>BcPDR1-M3</i>	BcPDR1-M3-F	TTTACATCGATTCAATCATTCAATTTGCTCAGCATT
	BcPDR1-M3-R	CGTTCGATTGACGTGAATGCTGAGCAAATGAATGA
<i>BcPDR1-M4</i>	BcPDR1-M4-F	ACTCACTGAAAATTTTCGTTACTACTCCCCATTTCG
	BcPDR1-M4-R	TTCACGACGAATACTCGAATGGGGGAGTGTAAGCG
<i>BcPDR1-M1</i>	RT-BcPDR1-M1-F	TGGCTGAGAGGTTACCGACT
	RT-BcPDR1-M1-R	TACATCAGGAGTCTTGGCACC
<i>BcPDR1-M2</i>	RT-BcPDR1-M2-F	GGTGCCAAGACTCCTGATGTA
	RT-BcPDR1-M2-R	CGTGAATGCTGAGCCAAGTTT
<i>BcPDR1-M3</i>	RT-BcPDR1-M3-F	CAAAGACCTCGATGAAGGGGT
	RT-BcPDR1-M3-R	ACCGAATGCCGAATGTGATG
<i>BcPDR1-M4</i>	RT-BcPDR1-M4-F	AGACCTCGATGAAGGGGTTCT
	RT-BcPDR1-M4-R	CGAATGGGGGAGAAGCGAAA
<i>BlpR</i>	BlpR-F	TCAAATCTCGGTCACGGGCAGGACC
	BlpR-R	ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGC
<i>GFP</i>	GFP-F	AGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG
	GFP-R	TTTGATAGTTCATCCATGCCATGT

子的基因组 DNA, 根据终载体上的 GFP 和 *BlpR* 基因设计特异性引物(表 1), 对转化子进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Hieff[®] Ultra-Rapid HotStart PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65/60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。同时, 以转化子的 cDNA 为模板, 利用基因特异性定量引物(表 1)进行 Real-time PCR 鉴定, 具体步骤根据通用荧光定量 PCR 试剂盒(Biosharp 公司)说明书进行。最终获得 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 菌株。

1.4 突变体的生长发育表型分析

将 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 菌株以及野生型 BC22、 $\Delta BcPDR1$ 和 CE 分别接种在 PDA 平板上, 25 $^{\circ}$ C 培养 3–14 d, 分别对各菌株的菌落形态和菌丝形态进行细致观察, 同时测量菌落的生长直径, 统计其生长速率。

1.5 突变体的致病力分析

采用番茄果实和烟草叶片作为试验材料, 对 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 菌株以及野生型 BC22、 $\Delta BcPDR1$ 和 CE 进行致病力检测。将接种病原菌的材料置于黑暗条件下, 保湿处理 24–48 h 后在正常条件下

培养, 每个菌株设置 3 个重复, 观察各菌株的致病情况, 并对各菌株的病斑面积进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 BcPDR1 蛋白关键氨基酸突变的载体构建

为确定 BcPDR1 蛋白的关键氨基酸位点, 将 BcPDR1 蛋白的氨基酸序列与 TetR 家族转录因子 SmcR (PDB: 3KZ9)、HapR (PDB: 2PBX)、DesT (PDB: 3LSR) 进行多序列比对。结果发现, BcPDR1 与 TetR 家族转录因子之间存在多个相对保守区域, 本研究选择 32–34 aa、76–95 aa、140–150 aa 和 189 aa 位点进行进一步地鉴定(图 1A)。利用基因定点突变技术, 构建 BcPDR1 蛋白定点突变的载体 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* (图 1B)。菌落 PCR 鉴定均得到了目的条带(图 1C), 经测序鉴定后, 成功获得了 BcPDR1 蛋白的关键氨基酸位点突变载体 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3*、*BcPDR1-M4*。

2.2 BcPDR1 蛋白关键氨基酸突变体的鉴定

通过 ATMT 转化和抗性筛选, 获得了 BcPDR1 蛋白关键氨基酸位点突变的转化子 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4*。在草铵膦抗性 PDA 上转化子均能正常生长, 而 $\Delta BcPDR1$ 则不能正常生长(图 2A)。利用重组载体上 *GFP*、*BlpR* 基因的特异性引物对转化子的基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 发现转化子均能扩增出目的条带, 而突变体 $\Delta BcPDR1$ 则未检测到目的条带, 表明重组载体成功转入突变体 $\Delta BcPDR1$ 中并能稳定表达(图 2B)。对转化子中 *BcPDR1* 的转录水平进行分析, 发现与 $\Delta BcPDR1$ 相比, 转化子中 *BcPDR1* 的表达水平均显著升高(图 2C), 表明 *BcPDR1-M1*、

BcPDR1-M2、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 突变体构建成功。

2.3 BcPDR1 蛋白关键氨基酸突变体的表型分析

本研究对 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4* 点突变体菌株与野生型 BC22、敲除突变体 $\Delta BcPDR1$ 以及互补菌株 CE 的表型进行对比观察。结果发现, 与 $\Delta BcPDR1$ 的表型相比, 4 个点突变体菌株在菌落形态、菌丝形态以及生长速率方面均未呈现明显差异, 但均显著区别于野生型 BC22 和互补菌株 CE。相较于野生型 BC22 和互补菌株 CE, 4 个点突变体以及敲除突变体 $\Delta BcPDR1$ 的菌落颜色更浅, 气生菌丝相对更薄, 在培养基上的生长情况呈现特定特征(图 3A); 在菌丝形态方面, 突变体的菌丝更为纤细, 其菌丝细胞的长度和宽度均有所减小(图 3B、3C); 在生长速率上, 突变体明显慢于野生型 BC22。其中, 野生型 BC22 在第 4 天就能长满整个培养皿, 而 4 个突变体均是在第 5 天才长满培养皿(图 3D)。

2.4 BcPDR1 蛋白关键氨基酸突变体的致病力分析

通过番茄果实和烟草叶片离体接种试验检测各菌株的致病力差异, 结果发现 4 个突变体菌株 (*BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3* 和 *BcPDR1-M4*)、野生型 BC22 以及互补菌株 CE 在接种后均能产生较为明显的病斑; 与之形成鲜明对比的是, 敲除突变体 $\Delta BcPDR1$ 在相同试验条件下均未产生肉眼可见的病斑。进一步对病斑面积进行量化分析发现, 野生型 BC22 和互补菌株 CE 所引发的病斑面积最大, 而 4 个点突变体菌株所造成的病斑面积均显著小于野生型 BC22 和互补菌株 CE。在 4 个点突变体中, *BcPDR1-M4* 引发的病斑面积相对最大, 且明显大于 *BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2* 和 *BcPDR1-M3* 所产生的病斑面积(图 4)。

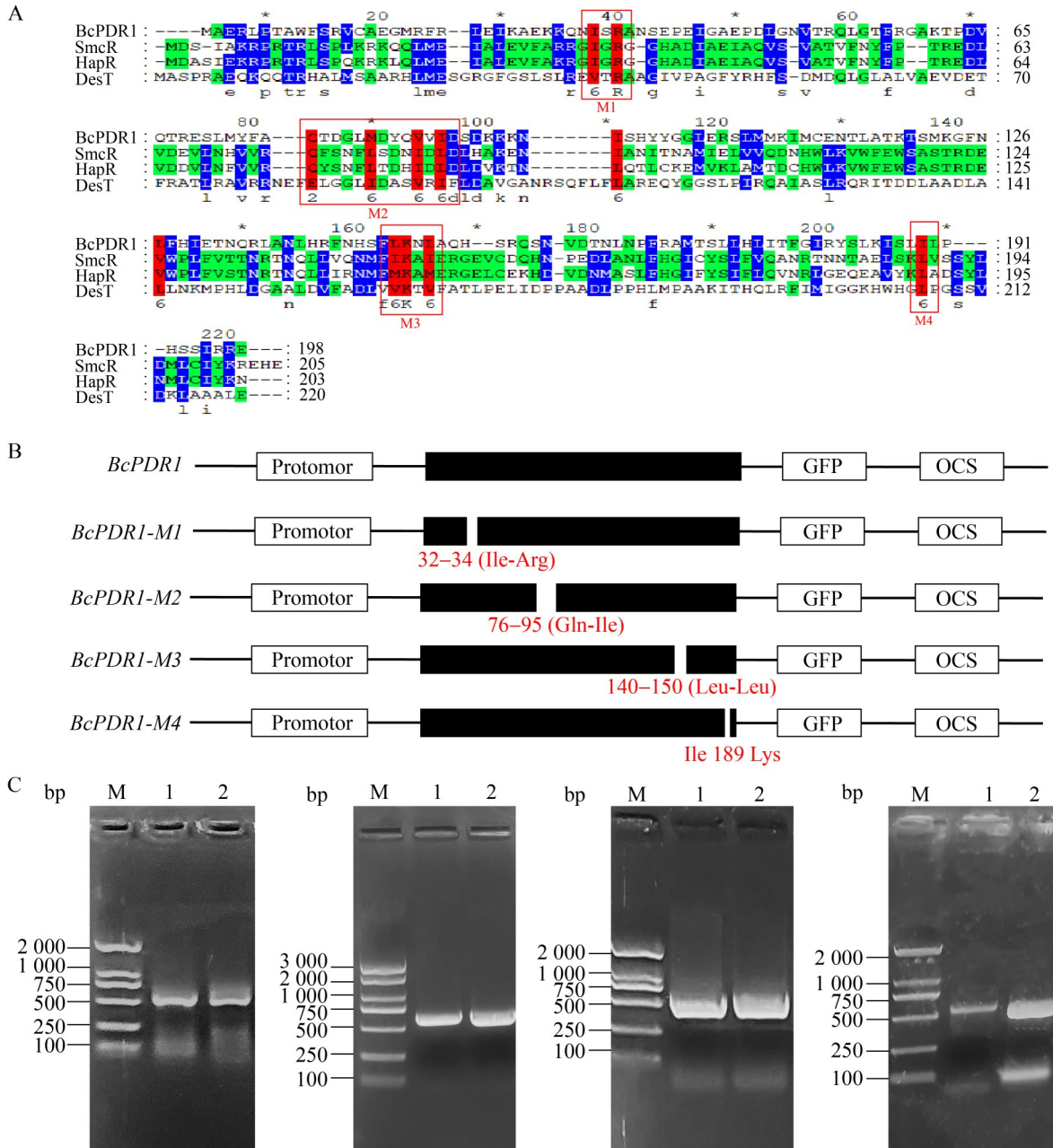


图1 灰葡萄孢*BcPDR1*蛋白关键氨基酸突变载体的构建。A: *BcPDR1*蛋白定点突变位点选择; B: *BcPDR1*蛋白定点突变载体的构建; C: 由左至右分别是*BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3*和*BcPDR1-M4*载体的菌落PCR鉴定。泳道M: DNA marker; 泳道1、2: 由左至右分别为*BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3*和*BcPDR1-M4*载体的2个菌落。

Figure 1 Construction of key amino acid mutation vector of *BcPDR1* protein in *Botrytis cinerea*. A: Selection of site-directed mutagenesis sites of *BcPDR1* protein; B: Construction of site-directed mutagenesis vector of *BcPDR1* protein; C: From left to right are the colony PCR identifications of *BcPDR1-M1*, *BcPDR1-M2*, *BcPDR1-M3*, and *BcPDR1-M4* vectors. Lane M: DNA marker; Lanes 1 and 2 are the corresponding bacterial samples of vectors *BcPDR1-M1*, *BcPDR1-M2*, *BcPDR1-M3*, and *BcPDR1-M4*.

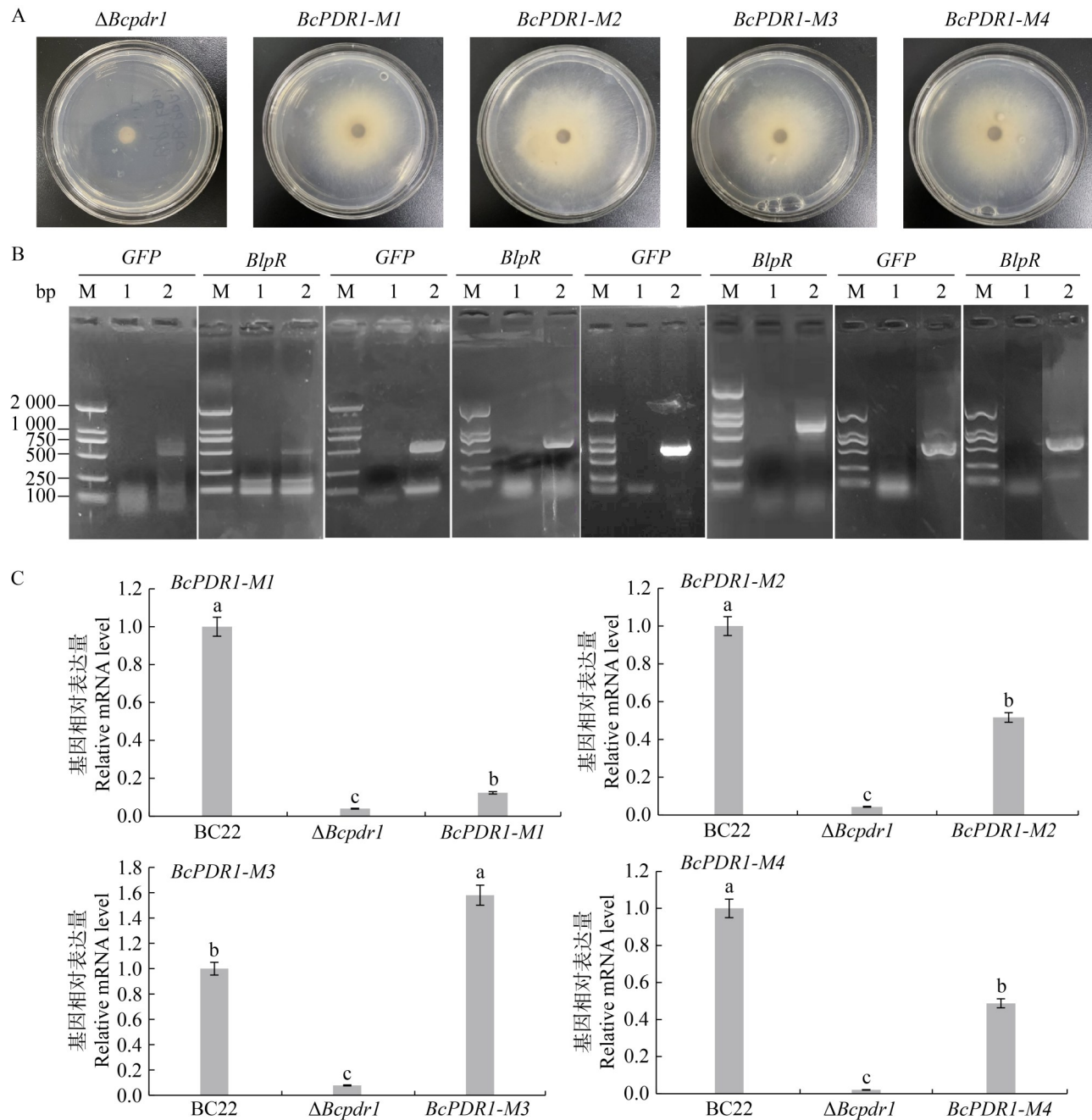


图2 灰葡萄孢*BcPDR1*蛋白关键氨基酸突变转化子的鉴定。A: 转化子在抗性平板上的生长情况; B: 转化子的PCR水平鉴定(泳道M: DNA marker; 泳道1: *ΔBcpdr1*基因组DNA; 泳道2分别为*BcPDR1-M1*、*BcPDR1-M2*、*BcPDR1-M3*和*BcPDR1-M4*转化子基因组DNA); C: 转化子的RT-qPCR鉴定。

Figure 2 Identification of key amino acid mutant transformants of BcPDR1 protein in *Botrytis cinerea*. A: Growth of transformants on resistant plate; B: PCR identification of transformants (Lane M: DNA marker; Lane 1: Genomic DNA of *ΔBcpdr1*; Lane 2 are the genomic DNAs of the *BcPDR1-M1*, *BcPDR1-M2*, *BcPDR1-M3*, and *BcPDR1-M4* transformants, respectively); C: RT-qPCR identification of transformants. Different lowercase letters indicate significant differences between strains ($P < 0.05$).

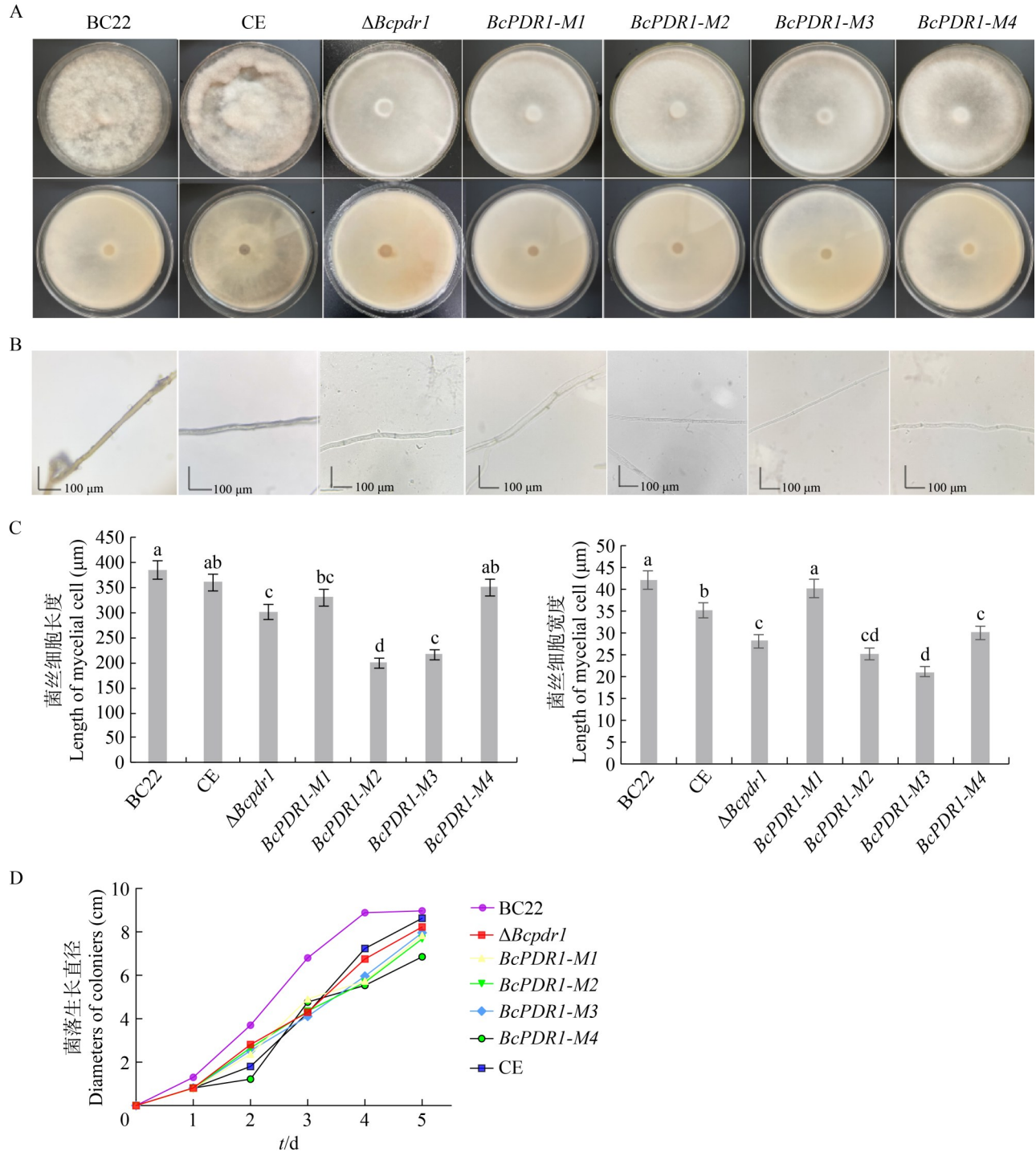


图3 灰葡萄孢BcPDR1蛋白关键氨基酸突变体的表型分析。A: 突变体的菌落形态; B: 突变体的菌丝形态; C: 突变体的菌丝细胞长度和宽度; D: 突变体的菌落生长速率。

Figure 3 Phenotypic analysis of key amino acid mutants of BcPDR1 protein in *Botrytis cinerea*. A: Colony morphology of mutants; B: Mycelial morphology of mutants; C: Length and width of the mycelial cells of mutants; D: Colony growth rate of mutants.

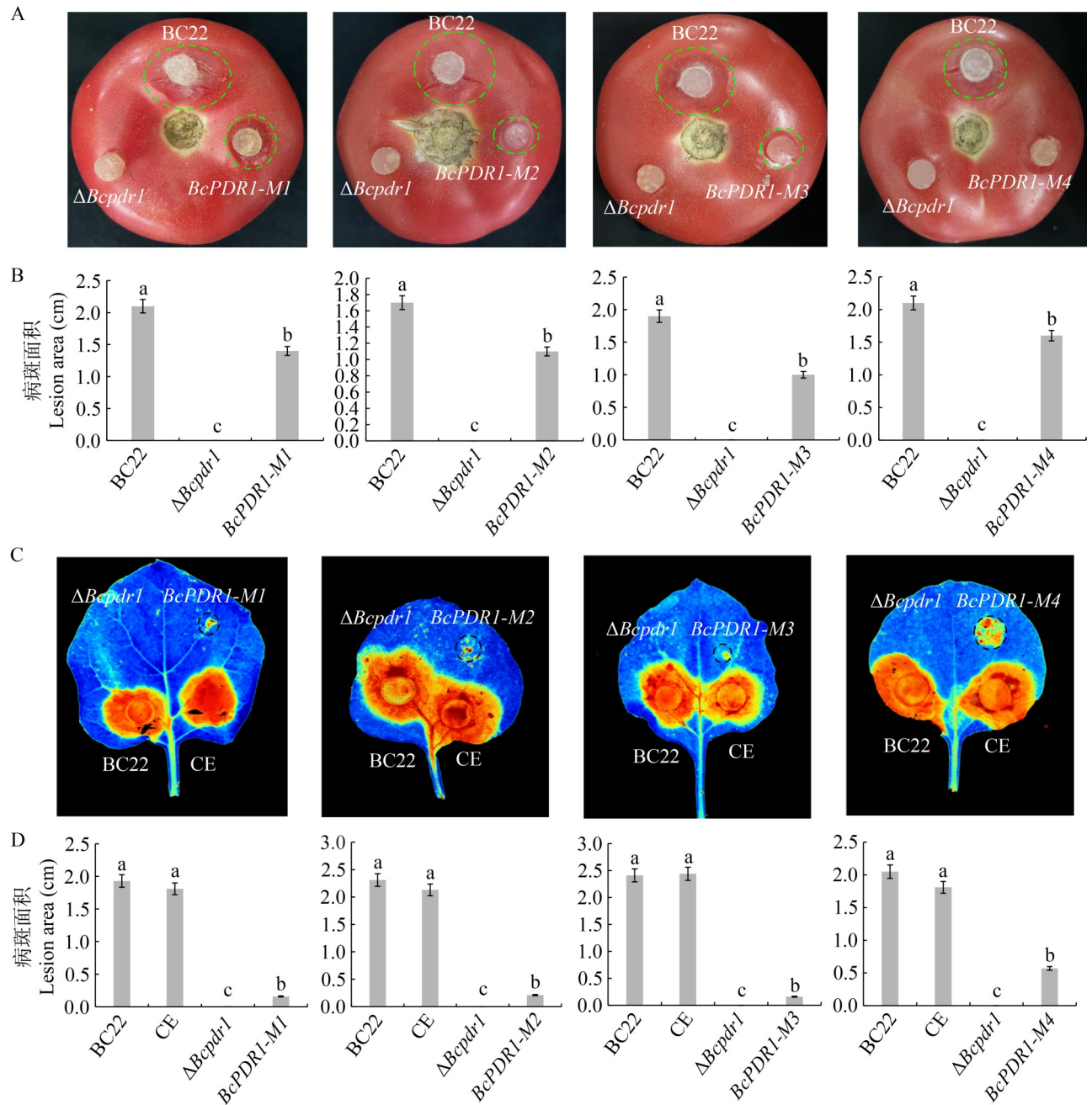


图4 灰葡萄孢BcPDR1蛋白关键氨基酸突变体的致病力分析。A: 突变体对番茄果实的致病力; B: 番茄果实发病部位的病斑面积统计[不同小写字母表示菌株间差异显著($P<0.05$)]; C: 突变体对烟草叶片的致病力; D: 烟草叶片发病部位的病斑面积统计[不同小写字母表示菌株间差异显著($P<0.05$)]。

Figure 4 Pathogenicity analysis of key amino acid mutants of BcPDR1 protein in *Botrytis cinerea*. A: Pathogenicity of mutants to tomato fruits; B: Statistics of lesion areas of tomato fruits, different lowercase letters indicate significant differences between strains ($P<0.05$); C: Pathogenicity of mutants to tobacco leaves; D: Statistics of lesion areas of tobacco leaves, different lowercase letters indicate significant differences between strains ($P<0.05$).

3 讨论

TetR 家族转录因子具有独特的分子结构特征：其 N 端为 DNA 结合结构域，C 端为配体结合结构域。这种独特的结构赋予了该家族成员双重功能，使其既能与 DNA 发生特异性结合，又可与多种配体分子相互作用^[13]。当小分子配体与之结合时能够诱导 TFRs 发生构象变化，进而对靶基因的表达产生抑制或激活的调控作用^[14]。正是基于这种结构-功能紧密耦合的特性，TFRs 得以广泛参与形态分化、氮代谢、脂类代谢、群体感应、细菌毒力调控以及抗生素生物合成等多样化的生理过程，通常作为阻遏蛋白发挥关键的调控作用^[15-16]。例如，在糖多孢红霉菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 中 TetR 家族转录因子 SACE₃₄₄₆ 通过负调控红霉素生物合成相关基因抑制抗生素的产生^[17]；而 SACE_0012 则通过抑制 *amfC* 同源基因 *SACE_7115* 调控形态发生^[18]。在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中，HapR 与 LuxT 作为群体感应调节剂^[19]，其中 LuxT 可直接抑制 HapR 的转录，解除毒力级联抑制^[20]。作为细菌体内核心转录因子，TFRs 在信号转导和转录调控中发挥着不可替代的关键作用，被视为极具开发潜力的广谱新药靶点^[21]。

然而，在植物病原真菌领域目前尚未有关于 TetR 家族转录因子的相关报道。本研究在灰葡萄孢中揭示了 TetR 成员的功能特征。尽管 BcPDR1 与经典的 TetR 成员 SmcR、HapR 的序列一致性极低，仅分别为 21% 和 29%，但通过高级结构预测发现，它具有典型的 TetR 特征——由多个 α -螺旋构成的同源二聚体构象，这为 BcPDR1 的家族归属提供了有力的结构生物学证据。本研究通过定点突变分析，精准定位了 BcPDR1 的 4 个关键功能区域：M1 (32–34 aa) 可能参与 DNA 结合活性，M4 (189 aa) 可能参与

配体结合，而 M2–M3 (76–95 aa 和 140–150 aa) 则可能在维持蛋白构象稳定性方面发挥作用。表型分析显示，突变体在菌落形态、菌丝生长等方面与敲除菌株 $\Delta BcPdr1$ 表现一致，但致病力显著减弱，证实这些位点直接参与了致病调控过程。

本研究不仅在植物病原真菌中验证了 TetR 家族成员的功能位点，更通过结构-功能关联分析揭示了真菌特异性致病调控网络的关键节点。结合当前分子生物学与遗传学的最新进展，本研究后续将基于 BcPDR1 的关键位点开展靶向药物设计工作，例如设计配体小分子、抑菌肽^[22]，以及运用 RNA 干扰技术(如采用外源 dsRNA/siRNA 的喷雾诱导基因沉默，即 SIGS^[23])。通过沉默 BcPDR1 或其下游效应因子，并充分利用外源 dsRNA 在植物-病原体系统中的传递特性，为实现灰霉病的高效精准防控以及开发新型杀菌剂提供全新思路，有望推动植物病理学与抗菌药物研发领域的交叉创新发展。

4 结论

灰葡萄孢 TetR 家族转录因子 BcPDR1 的 32–34 aa、76–95 aa、140–150 aa 和 189 aa 位点突变导致菌落形态、生长速率与敲除株 $\Delta BcPdr1$ 相似，且致病力显著下降，表明 BcPDR1 的 4 个关键氨基酸位点(32–34 aa、76–95 aa、140–150 aa、189 aa)是其调控灰葡萄孢生长发育和致病力的关键调控位点。本研究结果为阐明 TetR 家族转录因子在植物病原真菌中的作用提供关键理论支撑，并为基于该家族的新型杀菌剂研发开辟了分子靶标新方向。

作者贡献声明

曲德轩：试验操作、数据分析及文章撰写；刘晓颖：数据分析及文章撰写；魏雅迪：部分试验操作、

数据收集及分析; 藏金萍: 提供经费支持; 曹宏哲: 参与文章编辑和审阅; 张康: 参与技术指导及文章审阅; 邢继红: 提供技术指导, 研究构思和设计及文章审阅与修改; 董金皋: 项目申请、资源提供等贡献。

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] CHOQUER M, RASCLE C, GONÇALVES IR, de VALLÉE A, RIBOT C, LOISEL E, SMILEVSKI P, FERRIA J, SAVADOGO M, SOUIBGUI E, GAGEY MJ, DUPUY JW, ROLLINS JA, MARCATO R, NOÛS C, BRUEL C, POUSSEREAU N. The infection cushion of *Botrytis cinerea*: a fungal ‘weapon’ of plant-biomass destruction[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(4): 2293-2314.
- [2] 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.
- [3] BI K, LIANG Y, MENGISTE T, SHARON A. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(2): 211-222.
- [4] RHA E, PARK HJ, KIM MO, CHUNG YR, LEE CW, KIM JW. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 105-109.
- [5] STEFANATO FL, ABOU-MANSOUR E, BUCHALA A, KRETSCHMER M, MOSBACH A, HAHN M, BOCHET CG, MÉTRAUX JP, SCHOONBEEK HJ. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2009, 58(3): 499-510.
- [6] XU YR, LIU M, ZHAO RD, PAN Y, WU PP, ZHANG C, CHI XY, ZHANG BC, WU H. TetR family regulator AbrT controls lincomycin production and morphological development in *Streptomyces lincolnensis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 223.
- [7] JIAN PQ, LIU JH, LI L, SONG QQ, ZHANG D, ZHANG SY, CHAI CF, ZHAO H, ZHAO GR, ZHU HJ, QIAO JJ. AcrR1, a novel TetR/AcrR family repressor, mediates acid and antibiotic resistance and nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* F44[J]. *Journal of Dairy Science*, 2024, 107(9): 6576-6591.
- [8] XIAO PY, PAN DL, LI FY, LIU YY, HUANG Y, ZHOU XL, ZHANG Y. Effect of TetR family transcriptional regulator PccD on phytosterol metabolism of *Mycolicibacterium*[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(11): 2349.
- [9] ZHANG J, LIANG QT, XU ZH, CUI M, ZHANG QZ, ABREU S, DAVID M, LEJEUNE C, CHAMINADE P, VIROLLE MJ, XU DL. The inhibition of antibiotic production in *Streptomyces albidoflavus* over-expressing the TetR regulator SCO3201 IS correlated with changes in the lipidome of the strain[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1399.
- [10] LYU MY, CHENG YQ, HAN X, WEN Y, SONG Y, LI JL, CHEN Z. AccR, a TetR family transcriptional repressor, coordinates short-chain acyl coenzyme a homeostasis in *Streptomyces avermitilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(12): e00508-20.
- [11] BALHANA RJC, SWANSTON SN, COADE S, WITHERS M, SIKDER MH, STOKER NG, KENDALL SL. *bkaR* is a TetR-type repressor that controls an operon associated with branched-chain keto-acid metabolism in *Mycobacteria*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 345(2): 132-140.
- [12] RANG J, XIA ZY, SHUAI L, CAO L, LIU Y, LI XM, XIE J, LI YL, HU SB, XIE QJ, XIA LQ. A TetR family transcriptional regulator, SP2854 can affect the butenyl-spinosyn biosynthesis by regulating glucose metabolism in *Saccharopolyspora pogona*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 83-83.
- [13] WU PP, LI BW, CHEN KT, WU H, ZHANG BC. Ligands of TetR family transcriptional regulators: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2379-2392.
- [14] REICHHELD SE, YU Z, DAVIDSON AR. The induction of folding cooperativity by ligand binding drives the allosteric response of tetracycline repressor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22263-22268.
- [15] PÉREZ-VARELA M, TIERNEY ARP, DAWSON E, HUTCHESON AR, TIPTON KA, ANDERSON SE, HALDOPOULOS ME, SONG SN, TOMLINSON BR, SHAW LN, WEISS DS, KIM M, RATHER PN. Stochastic activation of a family of TetR type transcriptional regulators controls phenotypic heterogeneity in *Acinetobacter baumannii*[J]. *PNAS Nexus*, 2022, 1(5): pgac231.
- [16] HAYASHI T, TANAKA Y, SAKAI N, OKADA U, YAO M, WATANABE N, TAMURA T, TANAKA I. SCO4008, a putative TetR transcriptional repressor from *Streptomyces coelicolor* A3(2), regulates transcription of *sco4007* by multidrug recognition[J]. *Journal of*

- Molecular Biology, 2013, 425(18): 3289-3300.
- [17] ZHU L. SACE₃446, a TetR family transcriptional regulator controls the biosynthesis of erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*[D]. Hefei: Anhui University, 2012 (in Chinese).
- [18] YIN XJ, XU XQ, WU H, YUAN L, HUANG XD, ZHANG BC. SACE_0012, a TetR-family transcriptional regulator, affects the morphogenesis of *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(6): 647-651.
- [19] EBENBERGER SP, CAKAR F, CHEN YC, PRESSLER K, EBERL L, SCHILD S. The activity of the quorum sensing regulator HapR is modulated by the bacterial extracellular vesicle (BEV)-associated protein ObfA of *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2024, 13(9): e12507.
- [20] LI YH, YAN JX, LI JH, XUE XK, WANG Y, CAO BY. A novel quorum sensing regulator LuxT contributes to the virulence of *Vibrio cholerae*[J]. *Virulence*, 2023, 14(1): 2274640.
- [21] WANG YX, LI MS, YING JH, SHEN J, DOU DL, YIN MZ, WHISSON SC, BIRCH PRJ, YAN S, WANG XD. High-efficiency green management of potato late blight by a self-assembled multicomponent nanobioprotectant[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5622.
- [22] FAN L, WEI YY, CHEN Y, JIANG S, XU F, ELSHERBINY EA, SHAO XF. The antifungal ability of amino acid substitution of antimicrobial peptide epinecidin-1 to *Botrytis cinerea* in peach fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(32): 20375-20384.
- [23] SPADA M, PUGLIESI C, FAMBRINI M, PALPACELLI D, CANEO A, PECCHIA S. Spray-induced gene silencing (SIGS): nanocarrier-mediated dsRNA delivery improves RNAi efficiency in the management of lettuce gray mold caused by *Botrytis cinerea*[J]. *Agronomy*, 2025, 15(1): 194.