

粗糙脉孢菌中组氨酸激酶响应香芹酚胁迫的作用机制

陈鹏旭, 蓝子依, 席娟, 陈莹莹, 郑维发, 赵艳霞*

江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116

摘要: 以粗糙脉孢菌为研究材料, 探究组氨酸激酶在应对香芹酚胁迫下的作用。通过比较不同组氨酸激酶(HKs)缺失菌株与野生型粗糙脉孢菌在受香芹酚胁迫后的形态变化、抑菌圈形成、超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 以及类胡萝卜素的含量等, 研究 HKs 在应对香芹酚胁迫中的作用。研究发现, 除 $\Delta dcc1$ 外, 其他 hk 缺失菌株在香芹酚胁迫下均形成抑菌圈, 且丙二醛(MDA)的形成量增加。检测具抗氧化能力的 T-SOD 和 CAT 活性发现, $hcp1$ 和 $sln1$ 的敲除抑制了 T-SOD 的活性, $os1$ 、 $phy2$ 和 $hk1$ 的敲除抑制了 CAT 的活性, 且香芹酚胁迫仅能激发野生型、 $\Delta hcp1$ 、 $\Delta sln1$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株中的 T-SOD 的活性, 不能诱导 $\Delta hcp1$ 、 $\Delta nik2$ 、 $\Delta phy2$ 、 $\Delta luxq$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株中 CAT 的活性。类胡萝卜素是粗糙脉孢菌的主要组成成分且具抗氧化活性, $hk9$ 、 $os1$ 、 $sln1$ 、 $phy1$ 、 $phy2$ 、 $luxq$ 、 $hk1$ 和 $dcc1$ 的缺失抑制了类胡萝卜素的合成, 但是香芹酚的添加诱导 $\Delta sln1$ 、 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 突变体中类胡萝卜素的合成。粗糙脉孢菌通过 HKs 感知环境中香芹酚的信号, 通过调节 T-SOD 和 CAT 的活性以及类胡萝卜素的合成应对香芹酚的胁迫。

关键词: 组氨酸激酶; 香芹酚; 类胡萝卜素; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

[引用本文]

陈鹏旭, 蓝子依, 席娟, 陈莹莹, 郑维发, 赵艳霞, 2025. 粗糙脉孢菌中组氨酸激酶响应香芹酚胁迫的作用机制. 菌物学报, 44(4): 240268

Chen PX, Lan ZY, Xi J, Chen YY, Zheng WF, Zhao YX, 2025. Mechanism of histidine kinases in responses to carvacrol stress in *Neurospora crassa*. Mycosystema, 44(4): 240268

资助项目: 国家自然科学基金(31971564); 江苏师范大学 2024 年研究生科研与实践创新计划项目(2024XKT1512)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971564) and the 2024 Graduate Research and Practice Innovation Program Project of Jiangsu Normal University (2024XKT1512).

*Corresponding author. E-mail: zhaoyx0318@126.com

Received: 2024-09-26; Accepted: 2024-11-26

Mechanism of histidine kinases in responses to carvacrol stress in *Neurospora crassa*

CHEN Pengxu, LAN Ziyi, XI Juan, CHEN Yingying, ZHENG Weifa, ZHAO Yanxia*

School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

Abstract: The role of histidine kinases (HKs) in response to carvacrol stimulation in *Neurospora crassa* was investigated by comparing the morphological changes, the formation of growth-inhibition zone, total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT) activities, as well as carotenoid content between different *hk*-deficient mutants and the wild-type *N. crassa* under carvacrol stress. *hk*-deficient strains, with the exception of $\Delta dcc1$, exhibited a zone of growth-inhibition and increased malondialdehyde (MDA) synthesis under carvacrol stress. Analysis of T-SOD and CAT activities revealed that the deletion of *hcp1* and *sln1* resulted in inhibition of T-SOD activity, while the deletion of *osl*, *phy2*, and *hk1* led to reduction of CAT activity. Carvacrol stress stimulated T-SOD activity in the wild-type strain and $\Delta hcp1$, $\Delta sln1$, $\Delta dcc1$, and $\Delta hk16$ mutants. However, it did not induce CAT activity in the strains $\Delta hcp1$, $\Delta nik2$, $\Delta phy2$, $\Delta luxq$, $\Delta dcc1$, and $\Delta hk16$. Carotenoids are the main components within *N. crassa* and have antioxidant properties. It was observed that the deletion of *hk9*, *osl*, *sln1*, *phy1*, *phy2*, *luxq*, *hk1*, and *dcc1* resulted in inhibition of carotenoid synthesis, but the carvacrol stress promoted the synthesis of carotenoids in $\Delta sln1$, $\Delta luxq$, and $\Delta hk16$ mutants. In summary, *N. crassa* responded to carvacrol stress by regulating the activities of T-SOD and CAT and the synthesis of carotenoids through HKs which sense the signal from carvacrol.

Keywords: histidine kinase; carvacrol; carotenoids; malondialdehyde; superoxide dismutase

双组分信号转导系统(two-component systems, TCSs)广泛存在于黏菌、细菌以及真菌中,是微生物感知和适应环境变化的主要途径之一(Rajeev *et al.* 2020; Ishii & Eguchi 2021)。TCSs可以调控微生物的多种生理功能,如对物理和化学应激的抵抗力、细胞分裂、生物膜形成、群体感应和孢子形成等,以维持正常的生长繁殖(Bem *et al.* 2015; Calcáneo-Hernández *et al.* 2023)。经典的TCSs主要由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和应答调节蛋白(response regulator, RR)组成,通过磷酸化和去磷酸化反应调控细胞信号转导(Ortet *et al.* 2015; van Hoek *et al.* 2019; Bleul *et al.* 2021)。大多HK是同型二聚体,位于细胞膜或细胞内部,约83%的HK含跨膜区,胞外区是其识别外界信号的区域,不具有保守性。微生

物在感知信号后, HK自动磷酸化其保守的组氨酸残基,然后将磷酸转移至RR。磷酸化的RR主要充当转录调节因子并控制应激反应所需基因的表达。HK不仅在胞质外传感器域中感知信号,而且在胞质和跨膜域中感知信号。信号通过辅因子和辅助蛋白直接或间接感应(Cai *et al.* 2021; Xie *et al.* 2022)。越来越多的证据表明,单个HK可以感知并响应多个信号,并通过一系列的构象变化将信号传递到胞内(Cai *et al.* 2021; Yan *et al.* 2024)。构巢曲霉通过组氨酸激酶VadJ调节其生长发育和杂色曲霉素的合成(Zhao *et al.* 2021)。深绿木霉中的HK参与渗透应激反应(Calcáneo-Hernández *et al.* 2023)。组氨酸激酶Sln1通过转录因子Prf1调节黑粉菌的有性发育和毒力(Cai *et al.* 2021)。粗糙脉孢菌 *Neurospora*

crassa 作为遗传学研究的模式生物,其基因组简单,遗传背景清晰。生物信息学分析发现其含有 11 个编码 HK 的基因,每个基因均含有典型的 HK 结构域 HisKA 和 HATPase_c,其中只有 SLN1 具有跨膜结构域(Cabrera *et al.* 2022; Fleißner *et al.* 2022)。我们在前期研究中发现,粗糙脉孢菌中 HK 参与识别昆虫胁迫信号,调节脂质代谢和胡萝卜类化合物的合成等过程,以提高其抵御昆虫胁迫的能力(Sun *et al.* 2023; Lu *et al.* 2024)。但粗糙脉孢菌 HK 在应对环境化学物质胁迫中的功能未知。

香芹酚(2-甲基-5-异丙基苯酚)是一种单萜类苯酚,分子量小、脂溶性高、易通过细胞膜、对人体无毒,具有抗菌、抗氧化、抗炎等生物活性(Maktabi *et al.* 2024; Tópor *et al.* 2024)。香芹酚不仅对细菌,如:肠道沙门氏菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等具有显著的抑制效果(Heckler *et al.* 2021; Al-Tawalbeh *et al.* 2024; 孙伟等 2024),对青霉、灰霉菌和曲霉菌也表现出良好的杀伤作用(Fincheira *et al.* 2023; Duan *et al.* 2024; Moghadasi *et al.* 2024)。在微生物培养过程中,香芹酚的添加能对其造成胁迫,使其产生应激反应(Khan *et al.* 2017)。在香芹酚胁迫下,酿酒酵母的细胞形态和细胞壁膜的结构和功能等生理学特性发生变化(牛力源等 2024),白色念珠菌产生内质网应激(Chaillot *et al.* 2015)。然而丝状真菌应对香芹酚胁迫的机理尚未完全阐明。

本文以粗糙脉孢菌为研究材料,探究 11 个 HK 对香芹酚胁迫的响应,以期深入揭示真菌协调各种生理代谢平衡、抵御胁迫、适应环境的机制提供参考,为新型天然抑菌剂香芹酚的应用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基及培养条件

野生型粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 和 *hk*

突变体菌株信息及来源见表 1。Minimal medium 培养基(100 mL): 3 g 蔗糖, 2 mL 50×Vogel’s salt, 1.5 g 琼脂。利用 0.1%吐温 20 收集粗糙脉孢菌的分生孢子,采用血球计数板计数并稀释孢子悬浮液至 2×10⁶ 个/mL。

表 1 粗糙脉孢菌菌株及来源

Table 1 *Neurospora crassa* and source of strain

菌株	菌株编号	有性型	菌株来源
Strains	Strain number	Sexual type	Source of strain
Wild-type	87-3	<i>a</i>	FGSC
<i>Δhk9</i>	NCU09520	<i>a</i>	FGSC
<i>Δos1</i>	NCU02815	<i>a</i>	FGSC
<i>Δhcp1</i>	NCU07221	<i>a</i>	FGSC
<i>Δnik2</i>	NCU01833	<i>a</i>	FGSC
<i>Δsln1</i>	NCU04615	<i>a</i>	Sun <i>et al.</i> 2023
<i>Δphy1</i>	NCU04834	<i>a</i>	FGSC
<i>Δphy2</i>	NCU05790	<i>a</i>	FGSC
<i>Δluxq</i>	NCU02057	<i>a</i>	FGSC
<i>Δhk1</i>	NCU01823	<i>a</i>	FGSC
<i>Δdcc1</i>	NCU00939	<i>a</i>	FGSC
<i>Δhk16</i>	NCU03164	<i>a</i>	FGSC

FGSC: Fungal genetics stock center.

1.2 香芹酚对粗糙脉孢菌生长影响的测定

接种 2×10⁴ 个孢子至含 minimal medium 的平板中央,于 30 °C 恒温培养 3 d 后,在培养皿盖正中央滴加香芹酚原液(上海麦克林生化科技有限公司),使平板内香芹酚浓度为 0.1 μg/cm²,继续培养 1 d。拍照记录菌丝生长情况,并利用十字交叉法测定抑菌圈直径。

1.3 丙二醛(MDA)含量的测定

粗糙脉孢菌可溶性蛋白提取:液氮研磨粗糙脉孢菌培养物,加入适量的 Hepes 蛋白提取缓冲液,涡旋振荡混匀,冰浴 5 min。在 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。重复提取 3 次,合并上清液即为可溶性蛋白溶液。

过氧化脂质降解产物中的丙二醛可与巯代巴比妥酸缩合形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰。取可溶性蛋白 0.1 mL,参照丙二醛测试盒说明书(南京建成)检测粗糙脉孢菌培养物中 MDA 含量。

1.4 总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的测定

黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色。样品中 T-SOD 对超氧阴离子自由基有专一的抑制性,使形成的亚硝酸盐减少。参照 T-SOD 测定试剂盒说明书(南京建成)检测粗糙脉孢菌培养物中 T-SOD 的活性。

1.5 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

CAT 分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止,剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生淡黄色的络合物,在 405 nm 处测定其变化量,可计算出 CAT 的活力。取可溶性蛋白 0.1 mL,具体步骤参照 CAT 测定试剂盒说明书(南京建成)检测粗糙脉孢菌培养物中 CAT 的活性。

1.6 类胡萝卜素含量的测定

液氮研磨样品,以丙酮为提取溶剂浸提 24 h, 8 000 r/min 离心 15 min 取上清液,重复以上步骤 3 次。精密称取番茄红素及 β -胡萝卜素标准品,加丙酮配制成标准品储备液,并稀释成 5 个系列质量浓度的标准品溶液。参照 Sun *et al.* (2023)的方法,利用 HPLC 法检测类胡萝卜素含量。

1.7 统计学分析

所有实验均设置 3 个平行,结果采用 GraphPad Prism 8.0 绘图,两组计量数据比较采用 Student's T 检验统计学分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 香芹酚对粗糙脉孢菌生长的抑制

正常培养条件下,不同 *hk* 突变菌株与野生型(WT)菌株生长表型差异对比发现,WT 菌株菌丝呈橘色,形成大量分生孢子; $\Delta os1$ 、 $\Delta sln1$ 菌株量减少,菌丝发白,分生孢子数量降低; $\Delta hk1$ 产生大量褐色物质; $\Delta dcc1$ 分生孢子数量增加;

其他突变菌株菌丝体蓬松,分生孢子数量降低。在香芹酚的胁迫下,WT 菌株呈现的橘色加深,分生孢子数量增加; $\Delta dcc1$ 菌株未形成抑菌圈,与正常培养条件下无明显差异; $\Delta hk9$ 、 $\Delta os1$ 、 $\Delta hcp1$ 、 $\Delta nik2$ 、 $\Delta luxq$ 菌株菌丝抑制率均达到 50% 以上。正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株之间对比发现:香芹酚胁迫后, $\Delta hk1$ 产生更多的褐色物质,形成少量分生孢子;其他菌株菌丝体橘色加深(图 1)。

2.2 香芹酚对丙二醛(MDA)含量的影响

MDA 是脂质过氧化的产物之一,其含量与脂质过氧化程度呈正相关。正常培养条件下,野生型(WT)菌株膜脂过氧化程度低, *hk* 突变菌株与 WT 菌株相比, $\Delta phy1$ 、 $\Delta phy2$ 、 $\Delta dcc1$ 菌株膜脂过氧化程度严重,是 WT 的 2–3 倍; $\Delta os1$ 、 $\Delta nik2$ 和 $\Delta sln1$ 菌株膜脂过氧化程度较低。经香芹酚处理后,WT 菌株膜脂过氧化加重, *hk* 突变菌株与 WT 菌株相比, $\Delta os1$ 和 $\Delta phy2$ 菌株中的 MDA 含量是 WT 菌株的 5 倍; $\Delta hcp1$ 、 $\Delta phy1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株中 MDA 含量是 WT 菌株的 2 倍。正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株对比发现, $\Delta os1$ 和 $\Delta phy2$ 菌株的膜脂损伤程度加大, $\Delta hpy1$ 、 $\Delta luxq$ 和 $\Delta dcc1$ 菌株与正常培养条件下无明显差别(图 2)。

2.3 香芹酚对总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的影响

正常培养条件下,野生型菌株 T-SOD 含量为 169.00 U/mg prot, *hk* 突变菌株与 WT 菌株相比,除了 $\Delta hcp1$ 和 $\Delta sln1$ 菌株低于 WT 菌株外,其他均高于 WT 菌株。在香芹酚处理下, $\Delta sln1$ 菌株的 T-SOD 活性最大,为 265.43 U/mg prot。与 WT 菌株相比, $\Delta hk9$ 、 $\Delta os1$ 、 $\Delta phy1$ 和 $\Delta luxq$ 菌株 T-SOD 活性显著降低。正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株对比发现,WT 菌株 T-SOD 活性无明显差别, $\Delta hcp1$ 、 $\Delta sln1$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 突变体中 T-SOD 活性上升,其他菌株

均下降(图 3)。

2.4 香芹酚对过氧化氢酶(CAT)活性的影响

正常培养条件下, *hk* 突变菌株与 WT 菌株相比, $\Delta hcp1$ 、 $\Delta luxq$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株 CAT 活性显著提高。经香芹酚处理后, *hk* 突变菌株与 WT 菌株相比, $\Delta hcp1$ 和 $\Delta sln1$ 菌株 CAT 活性显著上升, $\Delta phy2$ 、 $\Delta luxq$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株

CAT 活性显著下降。正常培养条件下与香芹酚胁迫后的同一菌株之间对比发现, WT 菌株 CAT 活性显著升高, $\Delta hk9$ 、 $\Delta nik2$ 、 $\Delta phy1$ 和 $\Delta phy2$ 菌株在胁迫前后无明显差异, $\Delta os1$ 、 $\Delta sln1$ 和 $\Delta hk1$ 菌株在香芹酚胁迫下 CAT 活性约是处理前的 2 倍, $\Delta luxq$ 、 $\Delta dcc1$ 和 $\Delta hk16$ 菌株胁迫前 CAT 活性约是处理后的 2 倍(图 4)。

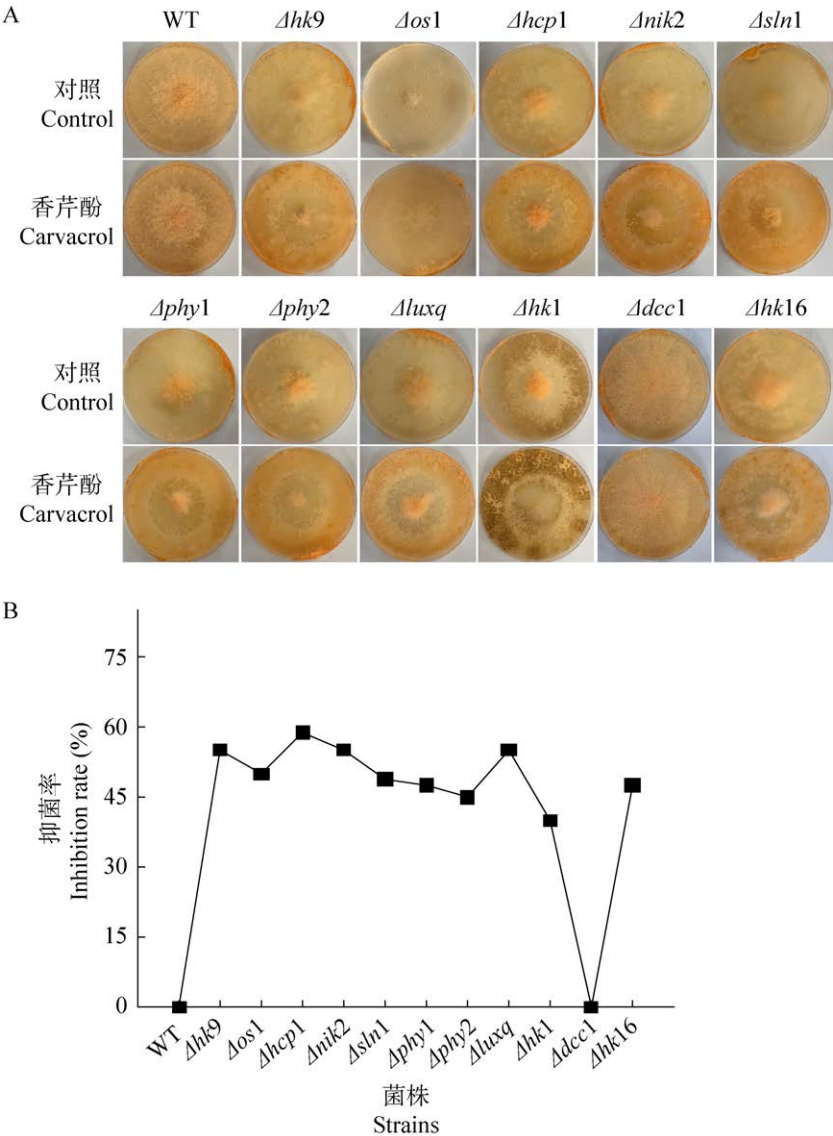


图 1 香芹酚对粗糙脉孢菌生长发育的影响 A: 不同 *hk* 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下的生长表型; B: 不同 *hk* 突变菌株在香芹酚胁迫下的抑制率

Fig. 1 Effects of carvacrol on the growth and development of *Neurospora crassa*. A: Phenotype of different *hk* mutants under normal culture and carvacrol stress; B: Inhibition rate of different *hk* mutants under carvacrol stress.

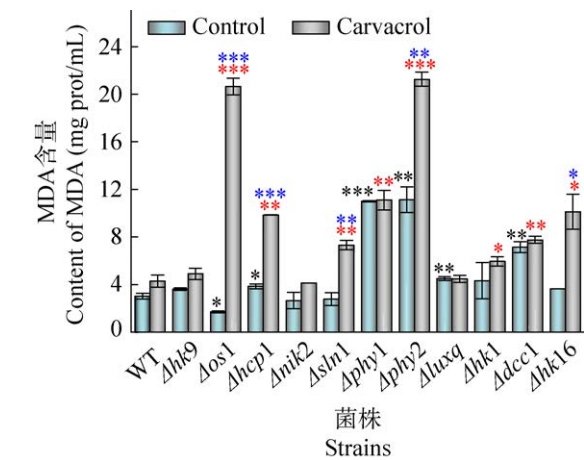


图 2 不同 *hk* 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下丙二醛 (MDA) 含量的变化 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 蓝色 * 代表同一菌株在正常培养条件和香芹酚胁迫下差异; 黑色 * 代表在正常培养条件下突变菌株与野生型之间的差异; 红色 * 代表在香芹酚胁迫下突变菌株与野生型之间的差异. 下同

Fig. 2 Changes of malondialdehyde (MDA) content in different *hk* mutants under normal culture and carvacrol stress. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; Blue * represents the difference between the same strains under normal culture conditions and carvacrol stress; Black * represents the difference between mutants and wild type strain under normal culture conditions; Red * represents the difference between mutant strains and wild-type strain under carvacrol stress. The same below.

2.5 香芹酚对类胡萝卜素含量的影响

hk 突变菌株与 WT 菌株相比, 正常培养条件下, $\Delta hcp1$ 、 $\Delta nik2$ 菌株链孢霉黄素比 WT 菌株高; 在香芹酚处理下, WT 菌株含量升高, $\Delta hk16$ 中链孢霉黄素比 WT 菌株高, 其他菌株中含量均下降。正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株对比发现, $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 中链孢霉黄素含量显著提高, 约是处理前的 1.5 倍和 2 倍 (图 5A)。

hk 突变菌株与 WT 菌株相比, 正常培养条件下, $\Delta hcp1$ 产生的 3,4-脱番茄红素约是 WT 菌株的 2 倍; 经香芹酚处理后, $\Delta hk1$ 菌株几乎不产番

产生 3,4-脱番茄红素, 而 $\Delta hk16$ 菌株产生的 3,4-脱番茄红素约是 WT 菌株的 3 倍; 正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株之间对比发现, 除了 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 菌株 3,4-脱番茄红素含量上升外, 其余菌株均下降 (图 5B)。

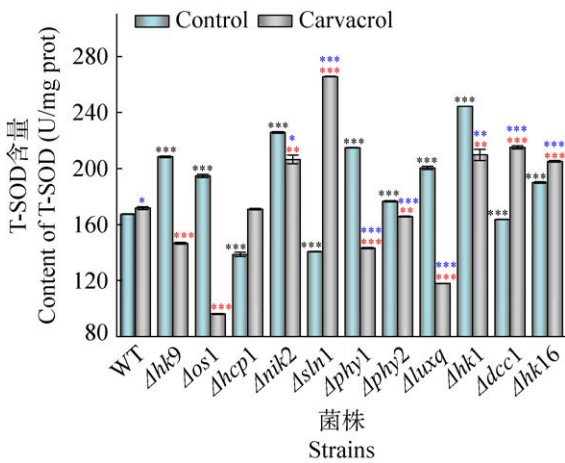


图 3 不同 *hk* 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的变化

Fig. 3 Changes of total superoxide dismutase (T-SOD) activity in different *hk* mutants under normal culture and carvacrol stress.

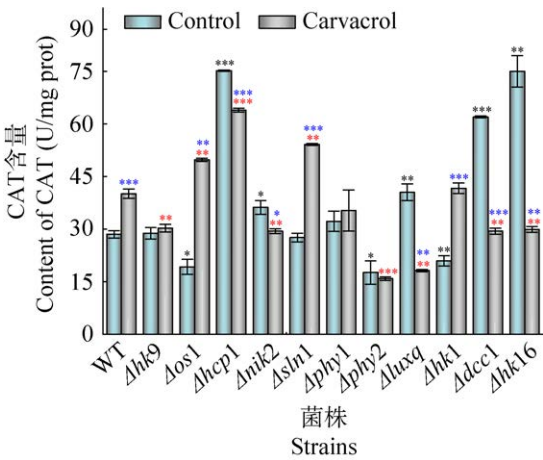


图 4 不同 *hk* 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下过氧化氢酶(CAT)活性的变化

Fig. 4 Changes of catalase (CAT) activity in different *hk* mutant strains under normal culture and carvacrol stress.

hk 突变菌株与 WT 菌株相比, 正常培养条件下, $\Delta hcp1$ 产生的番茄红素约是 WT 菌株的 2 倍; 经香芹酚处理后, $\Delta hk1$ 菌株几乎不产番

茄红素, $\Delta luxq$ 菌株产生的番茄红素约是 WT 菌株的 2 倍, $\Delta hk16$ 菌株产生的番茄红素约是 WT 菌株的 4 倍; 正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株之间对比, 除 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 菌株番茄红素含量上升外, 其余均下降(图 5C)。

hk 突变菌株与 WT 菌株相比, 正常培养条件下, $\Delta luxq$ 菌株产生更少的 γ -胡萝卜, 其他菌株与对照相比无明显差异。经香芹酚处理后, 与 WT 菌株相比, $\Delta hcp1$ 、 $\Delta nik2$ 、 $\Delta sln1$ 、 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 菌株产生的 γ -胡萝卜素显著提升; 正常培养条件下与香芹酚处理后的同一菌株之间对比, $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 菌株处理后 γ -胡萝卜素含量显著上升, $\Delta hk1$ 菌株含量显著下降, 其他菌株无明显差异(图 5D)。

经香芹酚处理后, 仅 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk16$ 菌株总类胡萝卜素总含量显著升高, 其他菌株均无明显差异或是显著下降(图 6)。

3 讨论

真菌在生长过程中受物理、化学、生物等因素的影响, 同时进化产生适应策略(文晴等 2023; 赵宽和徐建平 2023)。为寻求抑制真菌生长的方法, 揭示其抗抑菌剂的机制, 我们研究了 HKs 在粗糙脉孢菌抵御香芹酚胁迫中的功能。研究发现, 香芹酚对除 $\Delta dcc1$ 以外的 hk 敲除菌株的抑制率较高。 $phy1$ 、 $phy2$ 和 $dcc1$ 的敲除导致粗糙脉孢菌严重受损, 且香芹酚诱导了大多数菌株中 MDA 的积累。此外, 粗糙脉孢菌的组成

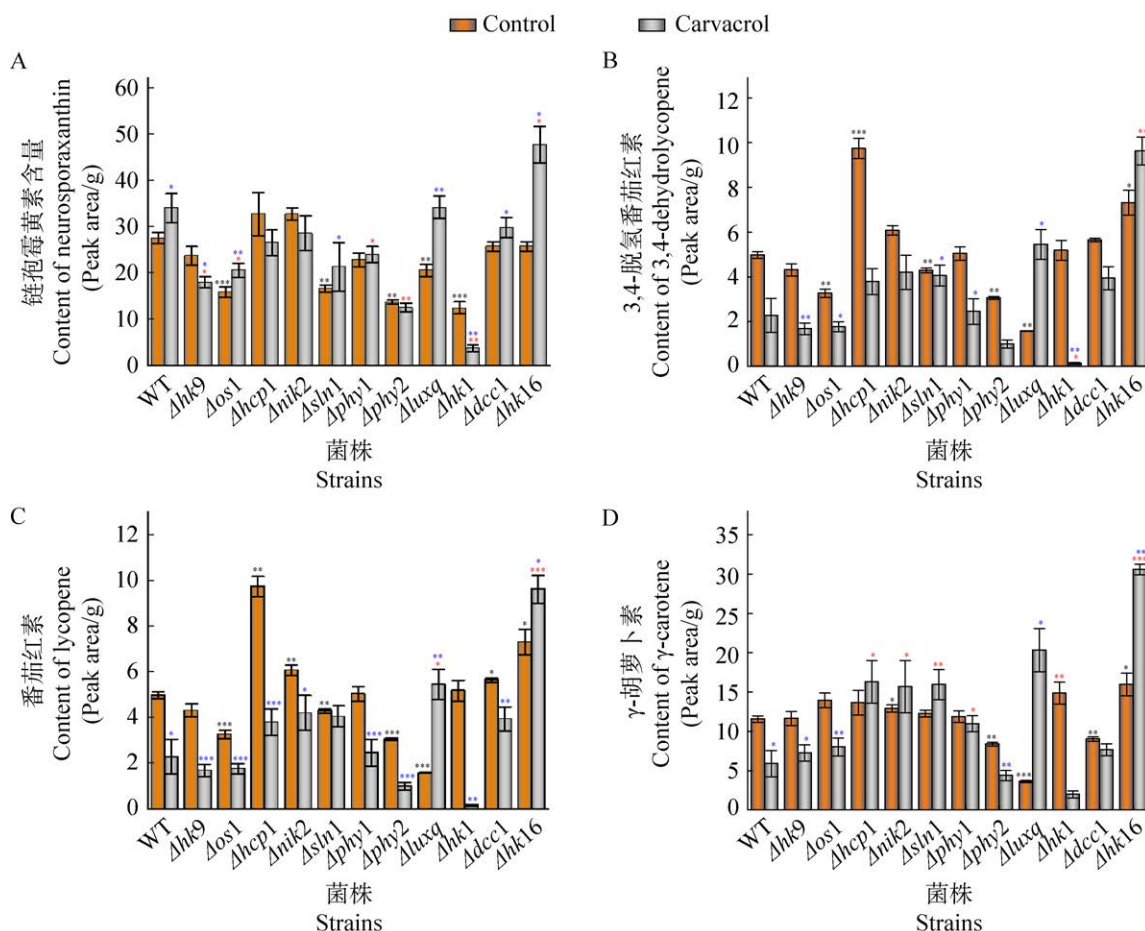


图 5 不同 hk 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下类胡萝卜素含量

Fig. 5 Carotenoid content in different hk mutants under normal culture and carvacrol stress.

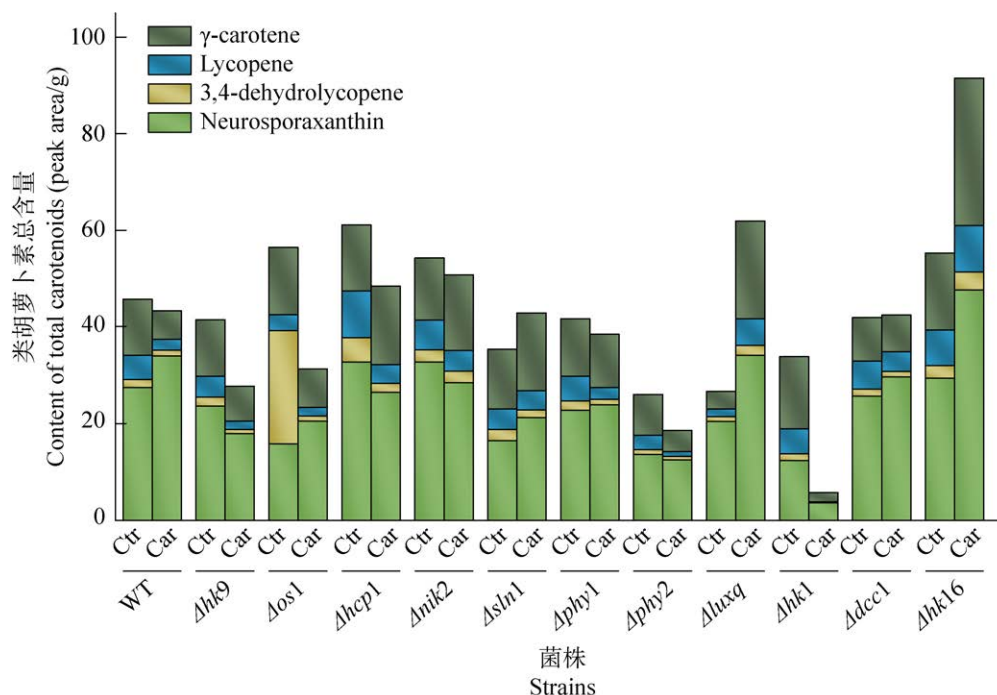


图 6 不同 *hk* 突变菌株在正常培养和香芹酚胁迫下类胡萝卜素总含量
Fig. 6 Content of total carotenoid in different *hk* mutants under normal culture and carvacrol stress. Ctrl: Control; Car: Carvacrol.

成分和细胞内具抗氧化能力的酶活性在抵御香芹酚胁迫中起作用。HKs 通过调节粗糙脉孢菌组成成分和酶的活性，提高其适应环境的能力。

香芹酚通过破坏微生物细胞膜的完整性和通透性、干扰物质和能量代谢等多种微生物具有抑制作用(王江来等 2022)。胁迫条件下，细胞内脂质发生过氧化生成 MDA。MDA 改变膜的结构和功能，引发细胞毒性。伴随着 *hk* 的缺失和香芹酚的胁迫，粗糙脉孢菌细胞内的 MDA 含量增加。说明，*hk* 的敲除和香芹酚的处理，增加了细胞脂质过氧化的程度，不利于生物的生长发育。

粗糙脉孢菌通过调节细胞内具有抗氧化能力的酶活性和细胞组成成分应对香芹酚的胁迫。T-SOD 能催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢，CAT 以过氧化氢为电子受体催化底物氧化，能消除过氧化氢等物质对细胞的损伤。香芹酚胁迫改变了粗糙脉孢菌内 T-SOD 和

CAT 的活性。具抗氧化能力的酶活性受 *hk* 调控，且 T-SOD 和 CAT 活性参与粗糙脉孢菌应对香芹酚胁迫过程。

类胡萝卜素属于萜类化合物，在生物体内，类胡萝卜素具有多种生物活性，并且其抗氧化活性较强(崔醒等 2022)。粗糙脉孢菌能产生链孢霉黄素、脱氢番茄红素、番茄红素和 γ -胡萝卜素等(Hornero-Méndez *et al.* 2018)。*hk9*、*os1*、*sln1*、*phy1*、*phy2*、*luxq*、*hk1* 和 *dcc1* 的敲除抑制了粗糙脉孢菌中类胡萝卜素的合成，香芹酚的添加仅促进了 $\Delta sln1$ 、 $\Delta luxq$ 和 $\Delta hk1$ 中类胡萝卜素的合成。HKs 在调节粗糙脉孢菌类胡萝卜素合成中起作用，并且在胁迫条件下类胡萝卜素合成的增加提高其适应胁迫的能力。

此外， $\Delta phy1$ 和 $\Delta phy2$ 表现出相似的生物学特性，通过序列比对发现，*phy1* 和 *phy2* 均属于 VIII 型 HK。然而，*dcc1* 和 *hk16* 均属于 XI 型 HK，但其在响应香芹酚胁迫中的特性不同， $\Delta dcc1$ 中

胡萝卜素含量增加、T-SOD 和 CAT 的活性增强,增加了其抵御香芹酚胁迫的能力,但 *Δhk16* 抵御香芹酚胁迫的能力较弱。不同 HKs 在响应香芹酚胁迫中存在差异,其内在原因有待通过研究双组分信号传导系统中的应答调节蛋白进一步揭示。但通过本研究可知,粗糙脉孢菌中 HKs 可以协同调控其生长和代谢过程以应对香芹酚胁迫。

作者贡献

陈鹏旭: 实验设计与实施、论文撰写; 蓝子依: 菌株培养, 图表制作; 席娟: 文献检索, 代谢物提取; 陈莹莹: 论文润色; 郑维发: 论文构思、框架设计; 赵艳霞: 论文修改。

利益冲突

作者声明, 该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Al-Tawalbeh D, Alkhawaldeh Y, Abu Sawan H, Al-Mamoori F, Al-Samydai A, Mayyas A, 2024. Assessment of carvacrol-antibiotic combinations' antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1349550
- Bem AE, Velikova N, Pellicer MT, Baarlen Pv, Marina A, Wells JM, 2015. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chemical Biology*, 10(1): 213-224
- Bleul L, Francois P, Wolz C, 2021. Two-component systems of *S. aureus*: signaling and sensing mechanisms. *Genes*, 13(1): 34
- Cabrera IE, Oza Y, Carrillo AJ, Collier LA, Wright SJ, Li L, Borkovich KA, 2022. Regulator of G protein signaling proteins control growth, development and cellulase production in *Neurospora crassa*. *Journal of Fungi*, 8(10): 1076
- Cai E, Sun S, Deng Y, Huang P, Sun X, Wang Y, Chang C, Jiang Z, 2021. Histidine kinase Sln1 and cAMP/PKA signaling pathways antagonistically regulate *Sporisorium scitamineum* mating and virulence via transcription factor Prf1. *Journal of Fungi*, 7(8): 610
- Calcáneo-Hernández G, Landeros-Jaime F, Cervantes-Chávez JA, Mendoza-Mendoza A, Esquivel-Naranjo EU, 2023. Osmotic stress responses, cell wall integrity, and conidiation are regulated by a histidine kinase sensor in *Trichoderma atroviride*. *Journal of Fungi*, 9(9): 939
- Chaillot J, Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown GW, Bellaoui M, Sellam A, 2015. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8): 4584-4592
- Cui X, Zhu QJ, Hou R, Wan Q, 2022. Antibacterial activity and mechanism of eugenol, carvacrol and thymol against *Fusarium graminearum*. *Food Science*, 43(23): 10-18 (in Chinese)
- Duan W, Zhu X, Zhang S, Lv Y, Zhai H, Wei S, Ma P, Hu Y, 2024. Antifungal effects of carvacrol, the main volatile compound in *Origanum vulgare* L. essential oil, against *Aspergillus flavus* in postharvest wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 410: 110514
- Fincheira P, Jofré I, Espinoza J, Levío-Raimán M, Tortella G, Oliveira HC, Diez MC, Quiroz A, Rubilar O, 2023. The efficient activity of plant essential oils for inhibiting *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*: mechanistic insights into antifungal activity. *Microbiological Research*, 277: 127486
- Fleißner A, Oostlander AG, Well L, 2022. Highly conserved, but highly specific: somatic cell-cell fusion in filamentous fungi. *Current Opinion in Cell Biology*, 79: 102140
- Heckler C, Sant'anna V, Brandelli A, Malheiros PS, 2021. Combined effect of carvacrol, thymol and nisin against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93 (Suppl. 4): e20210550
- Hornero-Méndez D, Limón MC, Avalos J, 2018. HPLC analysis of carotenoids in neurosporaxanthin-producing fungi. *Methods in Molecular Biology*, 1852: 269-281
- Ishii E, Eguchi Y, 2021. Diversity in sensing and signaling of bacterial sensor histidine kinases. *Biomolecules*, 11(10): 1524
- Khan ST, Khan M, Ahmad J, Wahab R, Abd-Elkader OH, Musarrat J, Alkhathlan HZ, Al-Kedhairi AA, 2017. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express*, 7(1): 49
- Lu T, Wang X, Chen P, Xi J, Yang H, Zheng W, Zhao Y, 2024. Adaptive responses of *Neurospora crassa* by histidine kinases upon the attack of the arthropod *Sinella curviseta*. *Current Genetics*, 70(1): 16
- Maktabi S, Rashnavadi R, Tabandeh MR, Sourestani MM, 2024. Effective inhibition of listeria monocytogenes

- biofilm formation by *Satureja rechingeri* essential oil: mechanisms and implications. *Current Microbiology*, 81(3): 77
- Moghadasi F, Roudbarmohammadi S, Amanloo S, Nikoomanesh F, Roudbary M, 2024. Evaluation of antifungal activity of natural compounds on growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Molecular Biology Reports*, 51(1): 53
- Niu LY, Sun XC, Liu JF, Wu ZH, Bai YH, Zhang ZJ, 2024. Physiological characteristics and transcriptome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under carvacrol stress. *Food Science*, 45(9): 75-83 (in Chinese)
- Ortet P, Whitworth DE, Santaella C, Achouak W, Barakat M, 2015. P2CS: updates of the prokaryotic two-component systems database. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue): D536-D541
- Rajeev L, Garber ME, Mukhopadhyay A, 2020. Tools to map target genes of bacterial two-component system response regulators. *Environmental Microbiology Reports*, 12(3): 267-276
- Sun M, Lu T, Chen P, Wang X, Yang H, Zhou R, Zheng W, Zhao Y, 2023. The sensor histidine kinase (SLN1) and acetyl-CoA carboxylase (ACC1) coordinately regulate the response of *Neurospora crassa* to the springtail *Sinella curviseta* (Collembola: Entomobryidae) attack. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(11): e0101823
- Sun W, Yuan YH, Yu YG, 2024. Evaluation of antimicrobial activity of carvacrol against *Bacillus cereus*. *Food and Fermentation Industry*, 50(18): 141-147 (in Chinese)
- Tópor A, Veras FF, Cacciatore FA, Silveira RD, da Silva Malheiros P, Welke JE, 2024. Carvacrol nanocapsules as a new antifungal strategy: characterization and evaluation against fungi important for grape quality and to control the synthesis of ochratoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 416: 110659
- van Hoek ML, Hoang KV, Gunn JS, 2019. Two-component systems in *Francisella* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 198
- Wang JL, Zhang JF, Ma JX, Liu L, Shen T, Tian YQ, 2022. Antibacterial activity and mechanism of carvacrol and eugenol against *Fusarium* rot. *Microbiology China*, 49(5): 1638-1650 (in Chinese)
- Wen Q, Zhao HY, Shao YH, Hu YR, Qi YC, Wang FQ, Shen JW, 2023. Content determination and factors influencing production of γ -aminobutyric acid content in fruiting bodies of main edible fungi in China. *Mycosystema*, 42(1): 231-243 (in Chinese)
- Xie Y, Li J, Ding Y, Shao X, Sun Y, Xie F, Liu S, Tang S, Deng X, 2022. An atlas of bacterial two-component systems reveals function and plasticity in signal transduction. *Cell Reports*, 41(3): 111502
- Yan Y, Zou L, Wei H, Yang M, Yang Y, Li X, Xia H, 2024. A typical two-component system, AtcR/AtcK, simultaneously regulates the biosynthesis of multiple secondary metabolites in *Streptomyces bingchenggensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 90: e0130023
- Zhao K, Xu JP, 2023. Analyses of genetic diversity reveal major forces impacting a local population of the gourmet mushroom *Cantharellus enelensis*. *Mycosystema*, 42(6): 1240-1257 (in Chinese)
- Zhao Y, Lee MK, Lim J, Moon H, Park HS, Zheng W, Yu JH, 2021. The putative sensor histidine kinase VadJ coordinates development and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Microbiological*, 59(8): 746-752

[附中文参考文献]

- 崔醒, 朱秋劲, 侯瑞, 万婧, 2022. 丁香酚、香芹酚和百里香酚对禾谷镰刀菌的抑菌活性及机制. *食品科学*, 43(23): 10-18
- 牛力源, 孙晓诚, 刘静飞, 吴梓好, 白艳红, 张志坚, 2024. 香芹酚胁迫下酿酒酵母的生理特性和转录组分析. *食品科学*, 45(9): 75-83
- 孙伟, 袁玉华, 余以刚, 2024. 香芹酚对蜡样芽孢杆菌的抑菌作用评价. *食品与发酵工业*, 50(18): 141-147
- 王江来, 张锦锋, 马金秀, 刘璐, 沈彤, 田永强, 2022. 香芹酚和丁香酚对腐皮镰刀菌的抑菌活性及抑菌机理. *微生物学通报*, 49(5): 1638-1650
- 文晴, 赵浩洋, 邵艳红, 胡延如, 戚元成, 王凤芹, 申进文, 2023. 中国主要食用菌子实体 γ -氨基丁酸含量测定及产量影响因素. *菌物学报*, 42(1): 231-243
- 赵宽, 徐建平, 2023. 纽芬兰鸡油菌群体遗传多样性的主要影响因素分析. *菌物学报*, 42(6): 1240-1257