

# 精氨酸甲基转移酶 BcHMT2 调控灰葡萄孢生长发育及致病力的分子机制

李宇波<sup>1,2#</sup>, 邓思琪<sup>1#</sup>, 董广恩<sup>1</sup>, 藏金萍<sup>1</sup>, 司贺龙<sup>1</sup>, 董金皋<sup>1,2</sup>, 邢继红<sup>1,2\*</sup>, 张康<sup>1,2\*</sup>

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

李宇波, 邓思琪, 董广恩, 藏金萍, 司贺龙, 董金皋, 邢继红, 张康. 精氨酸甲基转移酶 BcHMT2 调控灰葡萄孢生长发育及致病力的分子机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 3889-3901.

LI Yubo, DENG Siqi, DONG Guang'en, ZANG Jinping, SI Helong, DONG Jingao, XING Jihong, ZHANG Kang. Molecular mechanism of arginine methyltransferase BcHMT2 in regulating the growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 3889-3901.

**摘要:** 【目的】阐明精氨酸甲基转移酶在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)生长发育及致病过程中的作用。【方法】利用生物信息学手段对灰葡萄孢、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)等 8 种真菌的精氨酸甲基转移酶 HMT2 进行序列比对、系统发育分析与保守结构域预测, 明确了灰葡萄孢中编码该酶的基因为 *BcHMT2*。通过同源重组技术构建 *BcHMT2* 基因敲除突变体, 并进行表型鉴定与致病力分析。【结果】*BcHMT2* 敲除突变体生长速率显著减慢, 菌核产量和产孢量均降低; 菌丝细胞变小, 细胞壁降解酶活性降低, 分生孢子形态异常。此外, 该突变体对番茄果实和烟草叶片的致病力明显减弱。【结论】本研究揭示了 *BcHMT2* 在调控灰葡萄孢生长发育及致病过程中的作用, 为灰葡萄孢防控研究提供了新见解。

**关键词:** 灰葡萄孢; 精氨酸甲基转移酶; BcHMT2; 生长发育; 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).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: XING Jihong, xingjihong2000@126.com; ZHANG Kang, zk7588@126.com

Received: 2026-02-28; Accepted: 2026-03-17; Published online: 2026-03-24

# Molecular mechanism of arginine methyltransferase BcHMT2 in regulating the growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*

LI Yubo<sup>1,2#</sup>, DENG Siqi<sup>1#</sup>, DONG Guang'en<sup>1</sup>, ZANG Jinping<sup>1</sup>, SI Helong<sup>1</sup>, DONG Jingao<sup>1,2</sup>, XING Jihong<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Kang<sup>1,2\*</sup>

1 Hebei Key Laboratory of 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 elucidate the role of arginine methyltransferase in the growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. [Methods] Bioinformatics approaches were used to perform sequence alignment, phylogenetic analysis, and conserved domain prediction of the arginine methyltransferase HMT2 from eight fungal species, including *B. cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium graminearum*, and *Magnaporthe oryzae*. The gene encoding this enzyme in *B. cinerea* was identified as BcHMT2. The BcHMT2-deleted mutant was constructed via homologous recombination, followed by phenotypic characterization and pathogenicity assays. [Results] The BcHMT2-deleted mutant exhibited a significantly reduced growth rate, significantly weakened cell wall-degrading enzyme activity, and decreased sclerotial production and conidiation. Meanwhile, the hyphal cells became smaller and the conidial morphology was abnormal. In addition, the mutant displayed markedly attenuated pathogenicity on tomato fruits and tobacco leaves. [Conclusion] This study reveals the regulatory role of BcHMT2 in the growth, development, and pathogenicity of *B. cinerea*, providing novel insights into the research on the prevention and control of gray mold.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*; arginine methyltransferase; BcHMT2; growth and development; pathogenicity

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是一种危害性较强的植物病原真菌, 该菌种有性繁殖阶段归类于子囊菌门葡萄孢盘菌属, 无性繁殖阶段则属于盘菌亚门葡萄孢属<sup>[1-2]</sup>。在自然界中, 灰葡萄孢主要以无性态形式存在和传播。该菌分生孢子梗通常丛生, 细长且呈灰色至褐色, 顶端膨大并产生小突起, 其上着生球形或椭球形的分生孢子<sup>[3]</sup>。灰葡萄孢分布广泛, 传播迅速, 不仅是真菌分子生物学研究的重要模式生物, 也是农业生产中的毁灭性病原物。它主要通过分生孢子、菌丝、侵染垫及菌核侵染寄主, 可侵染

超过 2 000 种植物, 引发灰霉病, 造成巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。

灰葡萄孢的致病机制复杂, 主要包括 3 个阶段: 穿透寄主表皮、降解寄主细胞壁以及诱导寄主细胞死亡<sup>[5]</sup>。当寄主出现伤口时, 灰葡萄孢的菌丝和分生孢子可通过表皮损伤直接侵入寄主组织, 或利用侵染垫和附着胞等特化结构入侵植物幼嫩部位<sup>[6]</sup>。分生孢子附着于寄主表皮后会迅速形成附着胞, 进而侵入寄主细胞。在这一过程中, 侵染垫和附着胞起着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。侵入后, 灰葡萄孢可分泌多种细胞壁

降解酶, 涵盖多聚半乳糖醛酸酶、果胶酯酶、纤维素酶等, 通过分解植物细胞壁的核心组分实现侵染<sup>[9-10]</sup>。

蛋白质翻译后修饰是调控蛋白功能的重要方式, 其中组蛋白甲基化修饰尤为关键。甲基化修饰多发生于赖氨酸、精氨酸残基的侧链区域: 赖氨酸位点可形成单甲基化、二甲基化及三甲基化修饰, 精氨酸则以单甲基化、对称性二甲基化或非对称性二甲基化修饰为主<sup>[11]</sup>。精氨酸甲基化由蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferases, PRMTs)催化, 并以 *S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM)为甲基供体, 使蛋白质精氨酸残基的胍氮原子甲基化<sup>[12]</sup>。目前, 植物中 PRMTs 的研究主要集中在拟南芥和水稻等模式植物中, 拟南芥基因组中已鉴定出 9 种 PRMTs<sup>[13]</sup>, 水稻中鉴定出 8 种<sup>[14]</sup>。在酿酒酵母中, 已鉴定出 Hmt1、Hsl7 和 Rmt2 共 3 种 PRMTs, 其中 Hmt1 作为主要的精氨酸甲基转移酶, 参与核质转运、转录激活与延伸、mRNA 剪接及信号转导等多种生物学过程。在禾谷镰孢中, AMT1 被证实发挥主要生物学功能, 其缺失会导致病菌侵染力与致病力显著下降<sup>[15]</sup>。尽管精氨酸甲基转移酶在多种丝状真菌中已有研究, 但其在灰葡萄孢中的功能尚无报道。因此, 本研究利用生物信息学方法从灰葡萄孢中鉴定出精氨酸甲基转移酶基因 *BcHMT2*, 通过构建其敲除突变体分析其对灰葡萄孢生长、发育及致病力的影响。本研究旨在明确精氨酸甲基转移酶在灰葡萄孢生长发育及致病过程中的功能与调控机制, 一方面为深入解析该病原菌的致病分子机理夯实理论基础, 另一方面也为筛选新型防治靶点、攻克灰霉病防控难题提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所使用的同源重组载体为 pBS-pUC

载体。供试菌株为灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)野生型 B05.10, 番茄品种为‘京樊 502’, 烟草品种为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。以上材料均由本实验室提供。

### 1.2 灰葡萄孢 *BcHMT2* 基因的生物信息学分析

利用 Ensembl Fungi 数据库(<http://fungi.ensembl.org/index.html>)和 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获取灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和白色念珠菌(*Candida albicans*) 8 种真菌的 HMT2 蛋白序列。借助 ClustalX2 软件完成上述蛋白序列的多序列比对, 再利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 设置 bootstrap 重复次数为 500 次, 以验证发育关系的可信度。

### 1.3 *BcHMT2* 基因敲除突变体的构建

根据灰葡萄孢全基因组 DNA 序列设计 *BcHMT2* 基因前后 800 bp 分别为前、后同源臂。将前、后同源臂分别与 pBS-pUC 载体连接, 构建重组载体。通过原生质体转化技术将重组载体转入灰葡萄孢 B05.10 的原生质体中。转化成功后, 用含 0.1% 潮霉素和 0.2% 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的 RPDA 培养基覆盖长出的菌丝。待单菌落长出后, 将其转移至相同抗性的 PDA 培养基上, 于 20 °C 黑暗条件下培养。挑取菌落边缘菌丝转接至双抗 PDA 培养基, 重复筛选至少 3 次。

### 1.4 敲除转化子的分子鉴定

采用 CTAB 法分别提取灰葡萄孢野生型 B05.10 和 3 个转化子的基因组 DNA, 作为 PCR 模板进行 DNA 水平鉴定。分别提取灰葡萄孢野生型 B05.10 和 3 个转化子的 RNA, 然后用七步法反转录试剂盒(Biosharp 公司)合成 cDNA, 具

体步骤详见试剂盒说明书。以 *Tubulin* 基因为内参基因, 以野生型 B05.10 和 3 个转化子的 cDNA 为模板, 利用 qPCR 技术检测 3 个转化子中 *BcHMT2* 基因的表达水平。扩增体系(20  $\mu$ L): cDNA 3  $\mu$ L, 2 $\times$ Hieff qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 7  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.2  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 6 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59.5  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环。此外, 将野生型和 3 个转化子接种到 PDA 培养基中培养 14 d 后, 提取各菌株的总蛋白: 取研磨好的样品 1 g, 加入蛋白提取液 1 mL, 冰浴 10 min (每 2 min 混匀 1 次), 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 将上清分装后置于-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。然后利用 Western blotting 技术进行组蛋白 H3 及 H3R2me2a 的杂交检测。本研究所用引物见表 1。

表1 *BcHMT2*敲除载体构建引物

Table 1 Primers for construction of the *BcHMT2* knockout vector

| Gene names                   | Primer names         | Primer sequences (5'→3')         |
|------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| <i>BcHMT2</i>                | <i>BcHMT2</i> -I-F   | GCGGCCGCGAAAATTCTGAGCGGTTAAGGATT |
|                              | <i>BcHMT2</i> -I-R   | ACTAGTGATTATGTTTGTATTGTGCTTGGA   |
| <i>BcHMT2</i>                | <i>BcHMT2</i> -II-F  | CTCAGAGAGACTCTTCCAAATTCCTAAGTAA  |
|                              | <i>BcHMT2</i> -II-R  | GGTACCATCCCCGGGTATACTTTCCA       |
| <i>BcHMT2</i> , hygromycin B | <i>BcHMT2</i> -P1    | CCAGGGCCATCGAGCTTCAATATC         |
|                              | <i>BcHMT2</i> -P2    | AGGCGATGTTTCGGGGATTC             |
| <i>BcHMT2</i> , hygromycin B | <i>BcHMT2</i> -P3    | GTAGAAACCATCGGCGCAG              |
|                              | <i>BcHMT2</i> -P4    | AAACCCAACCTGTCTGCAGACCAAA        |
| <i>BcHMT2</i> , hygromycin B | <i>BcHMT2</i> -P5    | CTATTCCTTTGCCCTCGGA              |
|                              | <i>BcHMT2</i> -P6    | ATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGC         |
| <i>BcHMT2</i>                | <i>BcHMT2</i> -P7    | TCCTTGCAATGTTGAATCATAGCAT        |
|                              | <i>BcHMT2</i> -P8    | AGGTGACACATTGGAAACAAGGTGT        |
| <i>BcHMT2</i>                | <i>BcHMT2</i> -P9    | ATATAAATTAACGGCGAGGAGGTAA        |
|                              | <i>BcHMT2</i> -P10   | TCTTCAACATATAATTTAGTGCCGG        |
| <i>BcHMT2</i>                | <i>BcHMT2</i> -qRT-F | GTACCGATGCCTACCGTGAC             |
|                              | <i>BcHMT2</i> -qRT-R | CACCAGCTTTGGCACAGAAC             |
| <i>Tubulin</i>               | <i>Tubulin</i> -F    | TCTGGCGAGCACGGTCTTGACGGTT        |
|                              | <i>Tubulin</i> -R    | TGGCTCCAAATCGACGAGGACGGCA        |

## 1.5 $\Delta BcHMT2$ 突变体的菌落形态观察及生长速率测定

采用 8 mm 打孔器在同一生长阶段的野生型菌株与  $\Delta BcHMT2$  突变体菌株菌落边缘打取菌饼, 转接至无抗性 PDA 培养基, 置于 20  $^{\circ}$ C 黑暗环境培养 4 d。每日固定时段测定并记录菌落直径, 各菌株均设置 3 次生物学重复。利用 GraphPad Prism 软件对数据进行单因素方差分析, \*:  $P < 0.05$  差异显著; \*\*:  $P < 0.01$  差异极显著。

## 1.6 $\Delta BcHMT2$ 突变体的菌丝形态观察

分别将同时期的野生型和  $\Delta BcHMT2$  突变体菌株接种到无抗性 PDA 培养基上, 并在每个培养基中斜插 3 片灭菌盖玻片。于 20  $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养 5 d 后, 利用光学显微镜观察菌丝形态, 测量并记录野生型 B05.10 及突变体菌丝细胞的长度和宽度。每株菌株设置 3 个重复。

## 1.7 $\Delta BcHMT2$ 突变体胞壁降解酶活性测定

取野生型和  $\Delta BcHMT2$  突变体的菌盘放入液体 PDB 中, 在黑暗条件下培养 15 d, 取出菌片并用液氮速冻。称取 0.1 g 菌片进行研磨, 提取菌株胞内细胞壁降解酶; 采用过滤去除菌丝后的发酵液, 检测对应菌株的胞外酶活性。利用果胶酶活性检测试剂盒(Biopike 公司)和纤维素酶活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), 结合酶标仪检测各菌株细胞内、果胶酶(polygalacturonase, PG)和纤维素酶(cellulase, Cx)的活性。设置 3 组重复。

## 1.8 $\Delta BcHMT2$ 突变体分生孢子形态和产孢量测定

将同一生长期的野生型、 $\Delta BcHMT2$  突变体菌株接种至无抗性 PDA 培养基, 置于真菌培养箱培养 15 d。用适量的 ddH<sub>2</sub>O 冲洗平皿中的菌丝 2–3 次, 通过 4 层纱布过滤制备分生孢子悬浮液, 并使用血球计数板统计分生孢子数量。将分生孢子悬浮液吹吸混匀后, 在显微镜下观察分生孢子的形态。每株菌株设置 3 个重复。

## 1.9 $\Delta BcHMT2$ 突变体的致病力测定

分别将同一生长时期的野生型和  $\Delta BcHMT2$  突变体菌株接种到无抗性 PDA 培养基上, 培养 7 d 后, 各自取直径为 10 mm 的菌盘, 均匀放置于番茄和烟草叶片上。将接种后的植物置于保湿缸中, 于 25 °C 黑暗条件下培养, 接种 2 d 后记录病斑面积并拍照。每种处理设置 3 组重复。

# 2 结果与分析

## 2.1 灰葡萄孢精氨酸甲基转移酶基因 $BcHMT2$ 的鉴定

通过 Ensembl Fungi 和 NCBI 数据库获取灰葡萄孢、酿酒酵母、禾谷镰孢、稻瘟病菌、粗

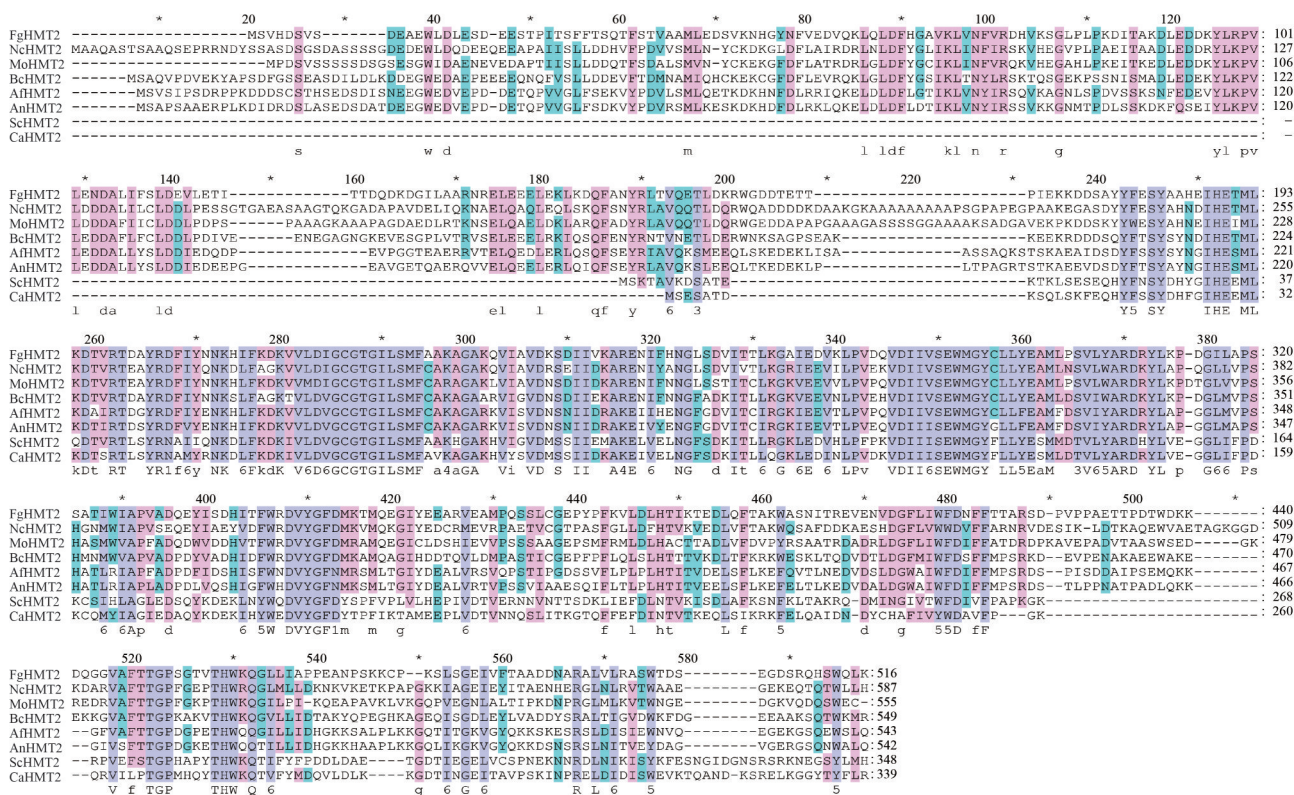
糙脉孢菌、黄曲霉、构巢曲霉和白色念珠菌共 8 种真菌的 HMT2 蛋白序列, 利用 MEGA 7.0 软件进行多序列比对及系统发育分析。结果显示, 8 种真菌的 HMT2 蛋白序列相似性较高(图 1A), 其中 BcHMT2 与其余 7 种蛋白的序列相似性分别为 57.05%、47.39%、56.82%、56.88%、60.04%、57.67%、50.17%, 表明 HMT2 在真菌界具有高度保守性且同源关系密切。进一步利用 SMART 和 Pfam 数据库分析保守结构域, 并通过 IBS 软件绘制结构域图谱, 发现所有供试真菌的 HMT2 蛋白均含有典型的甲基转移酶(methyltransferase)结构域(图 1B)。基于上述生物信息学分析, 初步推断  $BcHMT2$  为灰葡萄孢中编码精氨酸甲基转移酶的基因。

## 2.2 $BcHMT2$ 敲除突变体的构建与分子鉴定

依据  $BcHMT2$  基因敲除策略设计引物(图 2A), 对获得的 3 株转化子进行分子鉴定。DNA 水平鉴定显示, 利用同源臂引物 P1/P2 和 P3/P4 扩增, 3 株转化子均获得约 1 400 bp 的目标条带, 而野生型 B05.10 未扩增出相应条带; 利用潮霉素特异性引物 P5/P6 扩增, 转化子获得约 800 bp 条带, 野生型无条带。进一步利用验证引物 P1/P7、P8/P4、P9/P7 和 P8/P10 进行 PCR 鉴定, 结果显示野生型 B05.10 扩增出约 800 bp (P1/P7 和 P8/P4) 和 1 500 bp (P9/P7 和 P8/P10) 的特异性条带, 而转化子未获得相应条带(图 2B), 证明  $BcHMT2$  基因已被成功替换。

转录水平检测显示, 3 株转化子中  $BcHMT2$  基因的表达量较野生型均显著降低(图 2C)。蛋白水平上, Western blotting 检测组蛋白甲基化修饰水平发现, 与野生型相比, 转化子中组蛋白 H3R2me2a 的甲基化水平显著下降, 而组蛋白 H3 作为内参保持一致(图 2D)。上述结果证实成功构建了  $BcHMT2$  基因敲除突变体, 将其命名为  $\Delta BcHMT2$ -1、 $\Delta BcHMT2$ -2、 $\Delta BcHMT2$ -3。

A



B

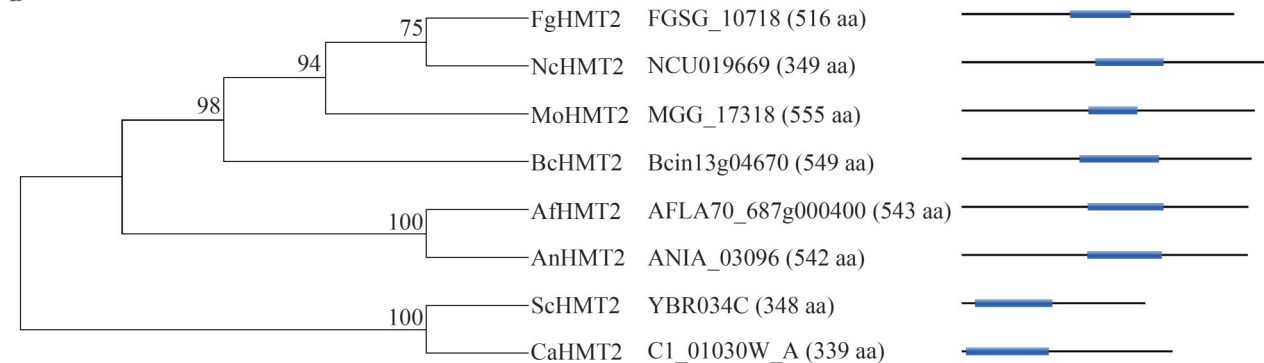
图1 *BcHMT2* 的系统发育分析与保守结构域

Figure 1 Phylogenetic analysis of *BcHMT2* and conserved domains of *BcHMT2*. A: Multiple sequence alignment of *BcHMT2* homologous sequences; B: Phylogenetic tree and conserved domains of *BcHMT2*.

## 2.3 $\Delta BcHMT2$ 突变体菌落形态观察及生长速率测定

将野生型 B05.10 和 3 株  $\Delta BcHMT2$  突变体接种于无抗性 PDA 培养基上, 在相同条件下培养观察。结果显示,  $\Delta BcHMT2$  突变体菌落颜

色较野生型(灰色)略浅, 且菌核产量明显减少(图 3A)。生长速率测定表明, 突变体的生长受到显著抑制: 培养 4 d 后, 野生型菌落直径达到 9.00 cm, 而 3 株突变体的菌落直径分别仅为 7.41、7.50、8.00 cm (图 3B)。这表明 *BcHMT2*

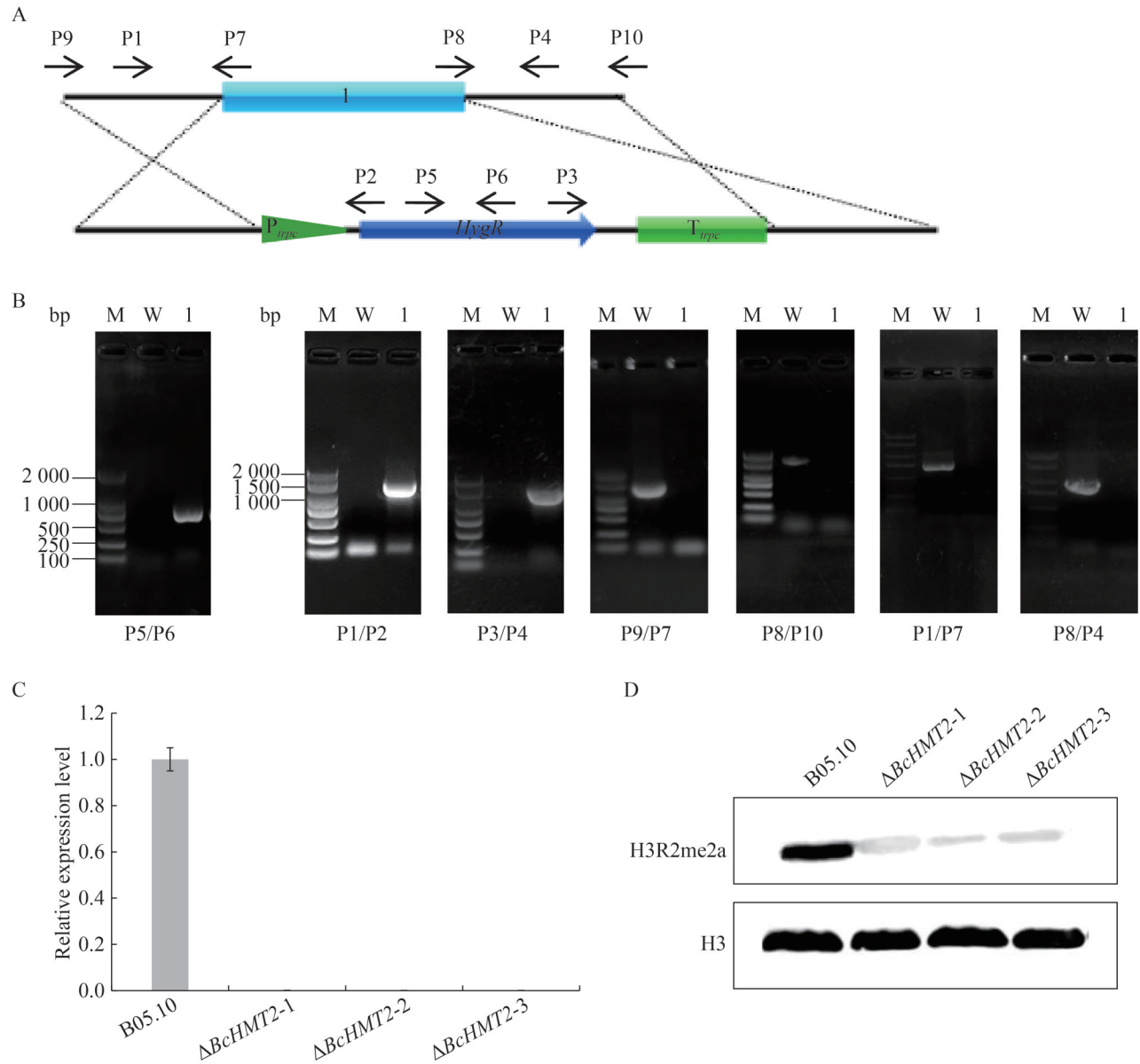


图2 *BcHMT2* 敲除突变体的分子鉴定

Figure 2 Molecular identification of the *BcHMT2* knockout mutants. A: Schematic diagram of the knockout strategy and primer design; B: DNA-level identification of transformants (W: B05.10, 1: Transformant); C: qPCR analysis of transformants; D: Western blotting analysis of histone methylation levels in transformants (\*\* indicates  $P < 0.01$ ).

基因对灰葡萄孢的营养生长至关重要。

## 2.4 $\Delta BcHMT2$ 突变体菌丝形态观察

显微镜观察发现,  $\Delta BcHMT2$  突变体的菌丝形态发生明显变化, 表现为菌丝直径变细、分

支减少(图 4A)。形态测量结果显示, 突变体菌丝细胞的长度和宽度均极显著减小(图 4B), 表明 *BcHMT2* 基因缺失影响了菌丝的细胞骨架构建或细胞壁合成。

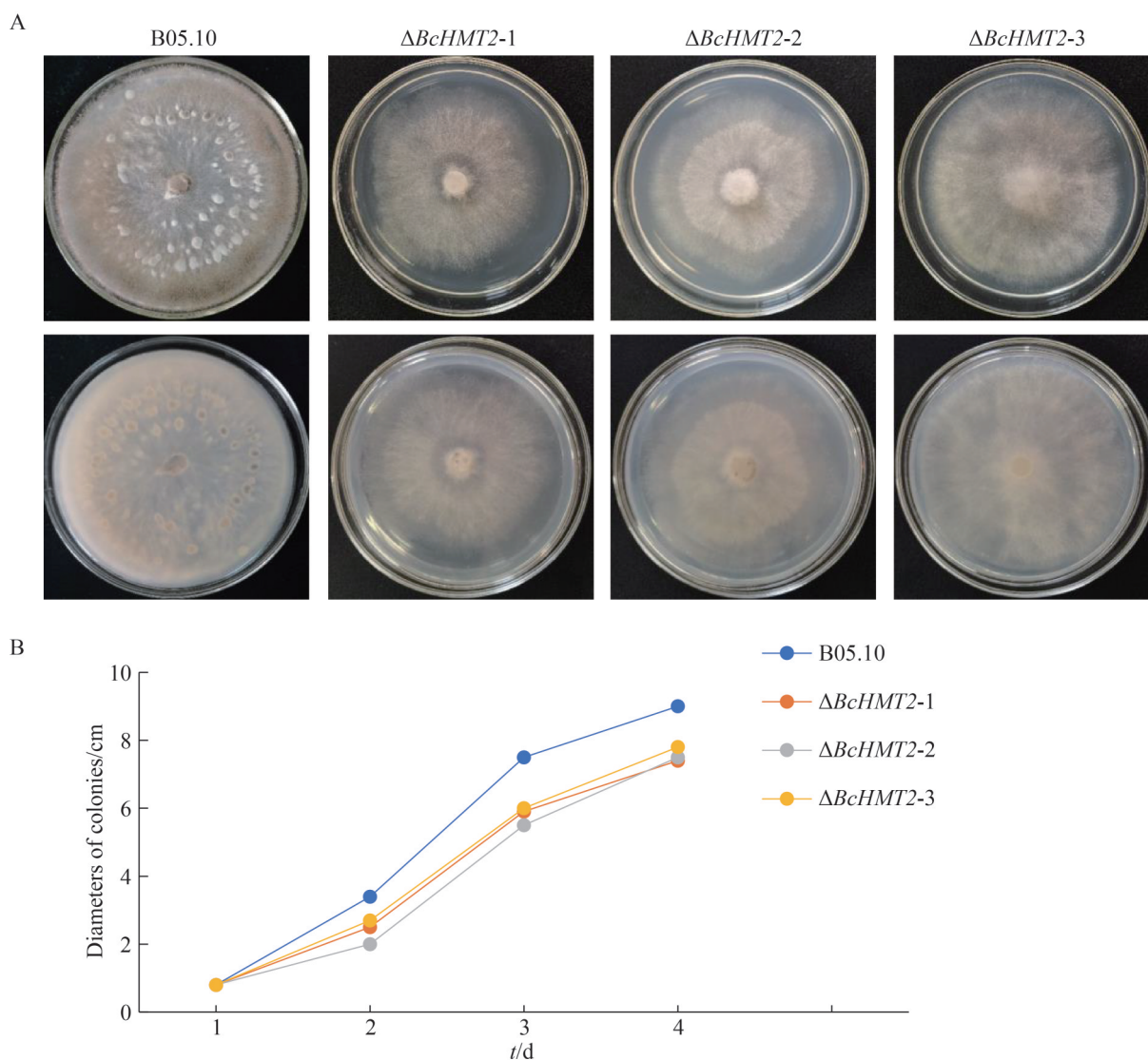


图3 野生型和突变体的菌落形态及生长速率

Figure 3 Colony morphology and growth rate of wild-type and mutant strains. A: Colony morphology on PDA medium; B: Determination of growth rate.

## 2.5 $\Delta BcHMT2$ 突变体胞壁降解酶活性测定

利用果胶酶和纤维素酶活性检测试剂盒检测野生型和 3 个  $\Delta BcHMT2$  突变体胞内(图 5A)、胞外(图 5B)果胶酶(PG)和纤维素酶(Cx)的酶活性。结果发现,与野生型相比,3 个  $\Delta BcHMT2$  突变体的 2 种酶活性均显著降低,表明  $BcHMT2$  基因在该过程中发挥正调控作用。

## 2.6 $\Delta BcHMT2$ 突变体分生孢子形态及产孢量分析

为探究  $BcHMT2$  基因对灰葡萄孢分生孢子发育的影响,利用光学显微镜观察野生型和突变体菌株的分生孢子形态。结果显示,野生型分生孢子呈饱满的椭圆形或圆形,而突变体的分生孢子体积明显偏小,形态多为不规则椭圆形(图 6A)。散点图统计进一步证实了突变体分

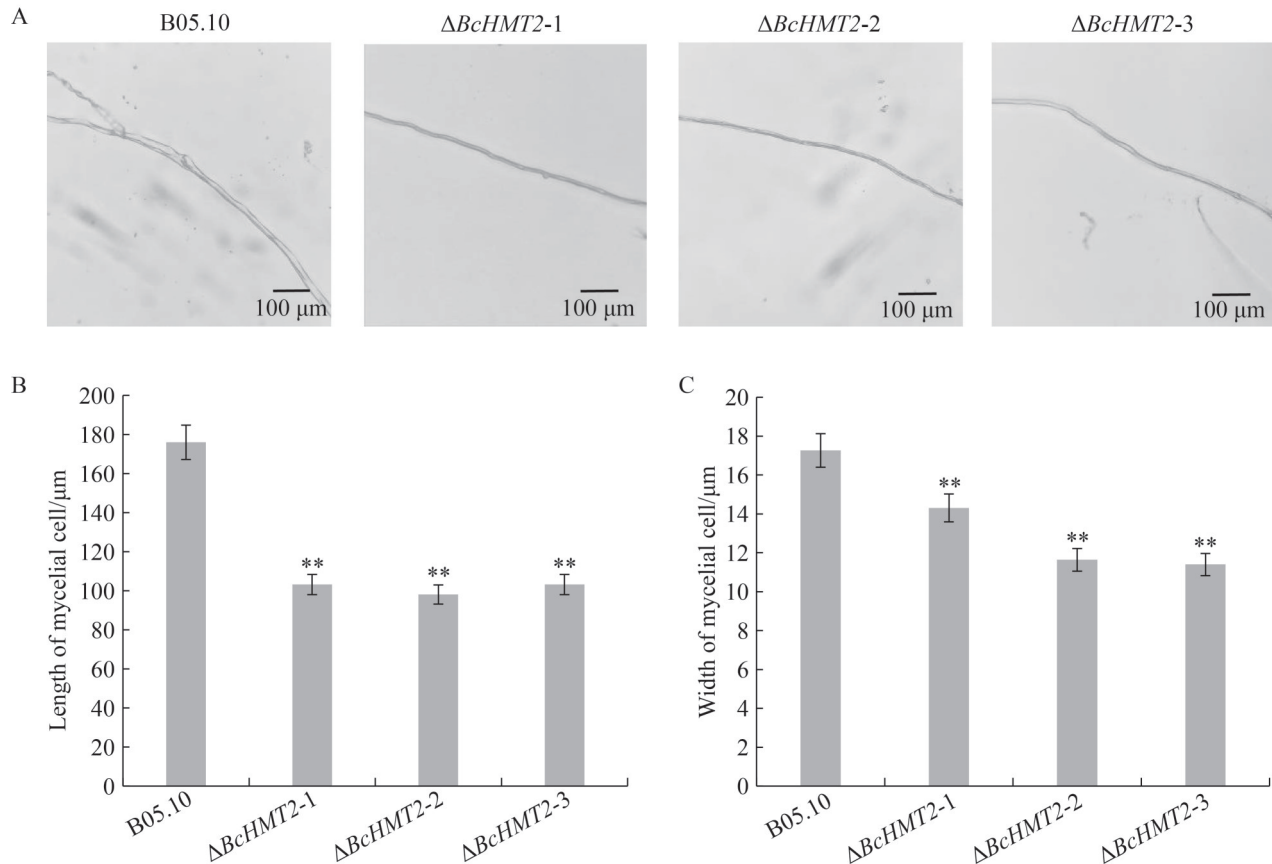


图4 野生型和突变体的菌丝形态观察

Figure 4 Hyphal morphology in wild-type and mutant strains. A: Hyphal morphology under light microscopy (scale bar: 100 μm); B: Statistical analysis of hyphal cell length and width (\*\*:  $P < 0.01$ ).

生孢子长宽比的异常(图 6B)。产孢量测定结果显示, 3 株突变体的产孢量均极显著低于野生型(图 6C), 表明 *BcHMT2* 基因是灰葡萄孢正常产孢所必需的。

### 2.7 *BcHMT2* 基因对病菌致病力的影响

致病力测定结果显示, 接种野生型菌株的番茄果实和烟草叶片均出现明显的腐烂症状和病斑扩展; 而接种  $\Delta BcHMT2$  突变体的组织仅出现小型水浸状斑点, 侵染能力明显减弱(图 7A、7C)。分析表明, 突变体在番茄和烟草上的病斑面积均极显著小于野生型(图 7B、7D)。上述结果表明, *BcHMT2* 基因的缺失导致灰葡萄孢致病力大幅下降。

## 3 讨论与结论

蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMTs)在真菌界具有高度保守性, 且在真菌生长发育调控及致病过程中具有重要生物学功能<sup>[16]</sup>。在稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 中, 基因组编码的 4 种精氨酸甲基转移酶中 *MoHMT1* 基因被证实是菌丝发育和分生孢子形成所必需的, 敲除 *MoHMT1* 基因导致菌落颜色变浅、生长速率减缓及产孢量显著下降<sup>[17]</sup>。在禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)中, 组蛋白精氨酸甲基转移酶 *AMT1* 调控病菌的营养生长, 其缺失突变体表现出明显的生长抑制表型<sup>[18]</sup>。在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)中, *rmtA* 不仅调节菌核的形成, 还是黄

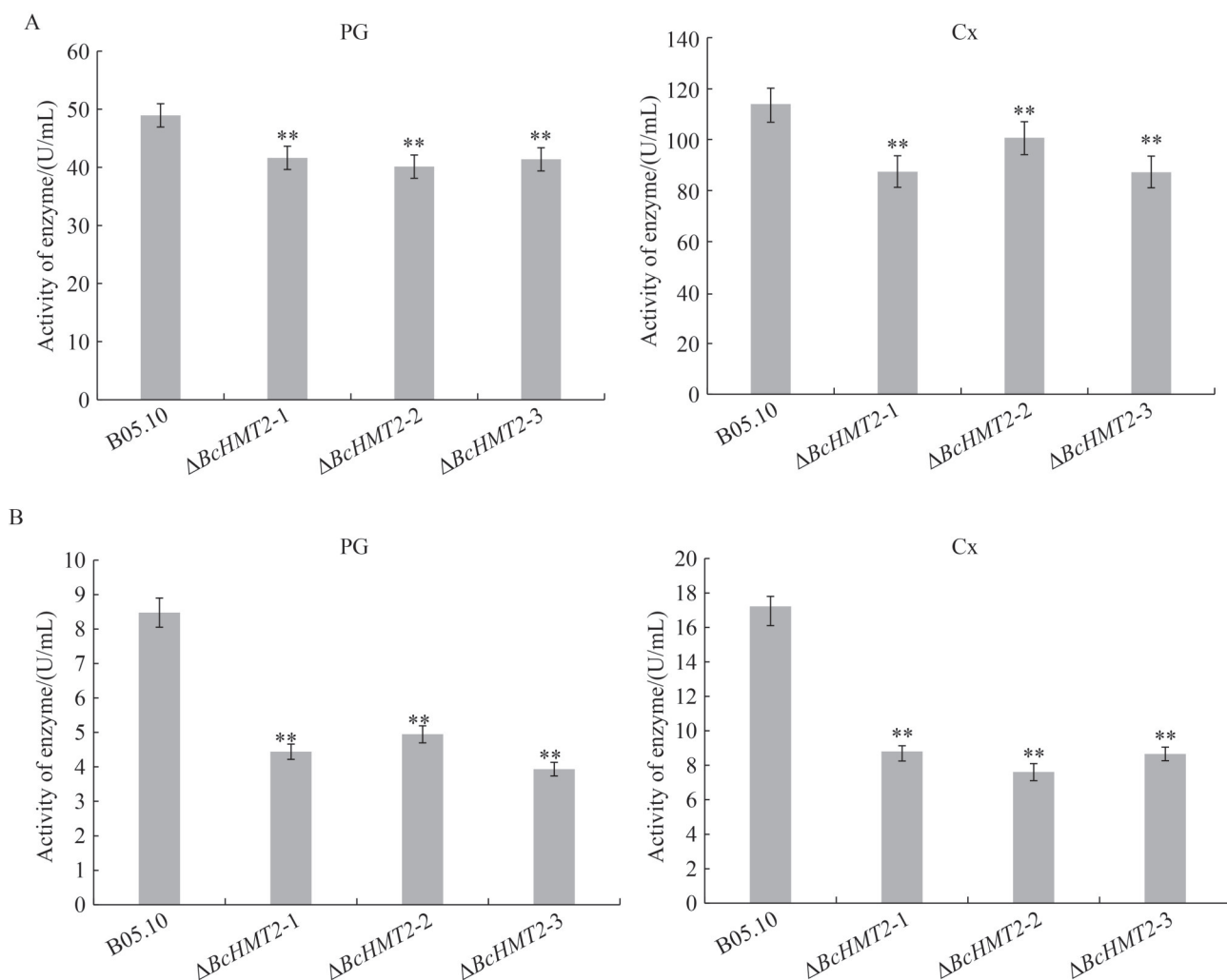


图5  $\Delta BcHMT2$ 突变体胞壁降解酶活性测定

Figure 5 Analysis of cell wall degrading enzyme activity in  $\Delta BcHMT2$  mutants. A: Intracellular cell wall degrading enzyme activity assay; B: Extracellular cell wall degrading enzyme activity assay (\*\*:  $P < 0.01$ ).

曲霉毒素 B1 合成及其他代谢产物合成的关键调控因子<sup>[19]</sup>。此外，在白色念珠菌(*Candida albicans*)中，*CaHMT1* 基因的缺失导致不对称二甲基精氨酸和  $\omega$ -单甲基精氨酸水平显著降低，表明其在精氨酸甲基化修饰中占据主导地位<sup>[20]</sup>。

近年来的研究进一步揭示了 PRMTs 在病原菌致病过程中的关键调控功能。稻瘟病菌作为全球性的主要作物病原菌，其 *MoHMT1* 基因敲除突变体在接种水稻和大麦幼苗后未能形成明显病斑，证实了 *MoHMT1* 在致病过程中的不可

或缺性<sup>[16-17]</sup>。在黄曲霉中，*rmtA* 通过正调控 *veA* 基因的表达进而影响黄曲霉毒素 B1 的合成及 *aflJ* 等基因的表达，深度参与了致病与毒素合成的调控网络<sup>[21]</sup>。

本研究利用同源重组技术，获得了灰葡萄孢 *BcHMT2* 基因的敲除突变体( $\Delta BcHMT2$ -1、 $\Delta BcHMT2$ -2 和  $\Delta BcHMT2$ -3)。表型分析结果显示，与野生型 B05.10 相比，*BcHMT2* 缺失导致菌落颜色变浅、生长速率显著减慢、菌核产量降低。微观形态观察发现，突变体菌丝细胞变

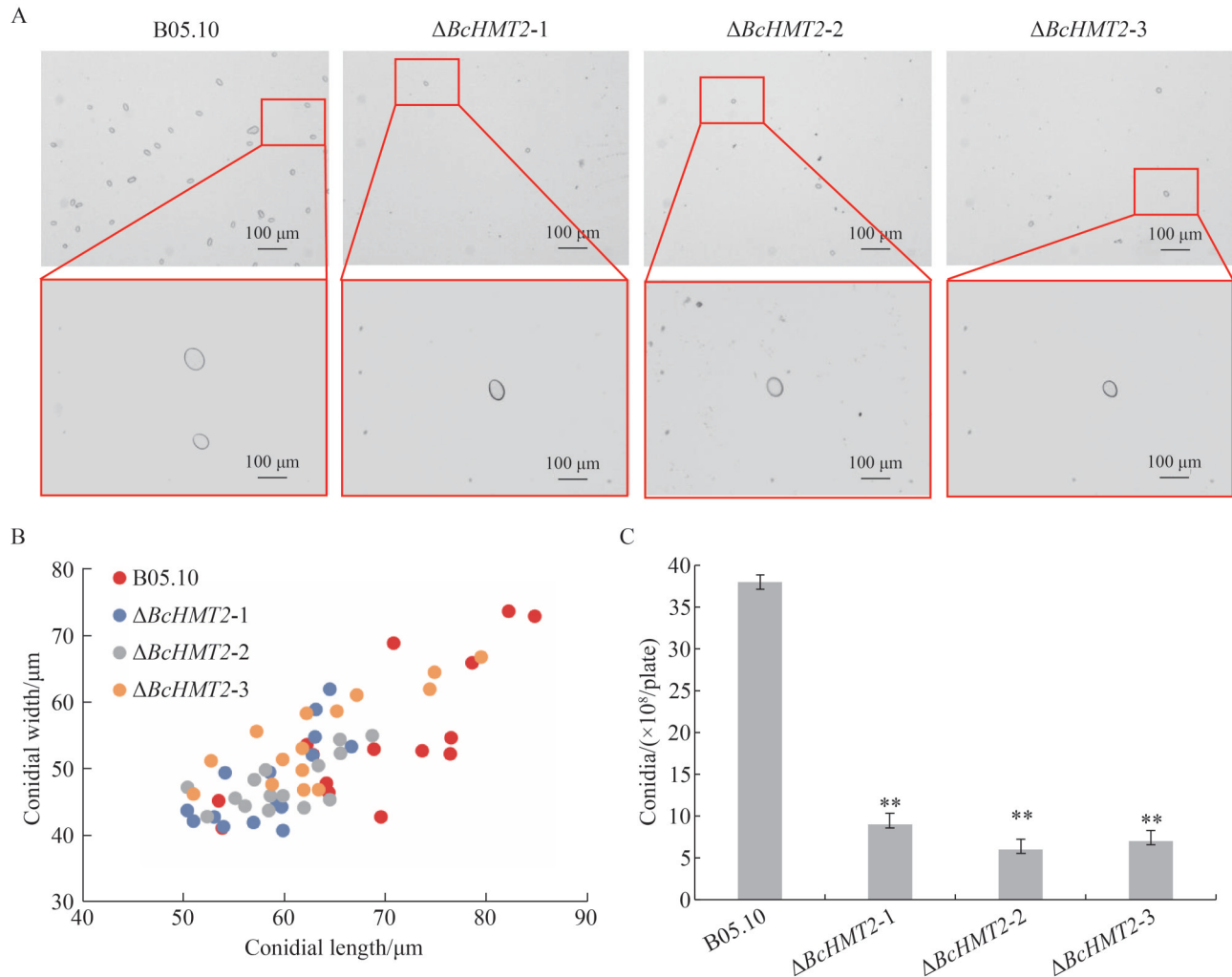


图6 野生型和突变体分生孢子形态及产孢量

Figure 6 Conidial morphology and conidiation yield in wild-type and mutant strains. A: Conidial morphology (scale bar: 100  $\mu m$ ); B: Scatter plot of conidial length-width ratio; C: Statistical analysis of conidial production (\*\* indicates  $P < 0.01$ ).

小、分生孢子形态异常(体积偏小且呈不规则椭圆形)。更重要的是,致病力测定表明,突变体对番茄果实和烟草叶片的致病力显著减弱,病斑扩展受到明显抑制。这些表型特征与稻瘟病菌 *MoHMT1* 和禾谷镰孢 *AMT1* 的缺失表型具有高度相似性,进一步证实了 HMT2 家族基因在丝状真菌生长发育和致病过程中的保守功能。Western blotting 结果显示, *BcHMT2* 的缺失导致组蛋白 H3R2me2a (不对称二甲基化)水平显著降

低,这与白色念珠菌中 *CaHMT1* 的功能一致,表明 *BcHMT2* 主要通过催化组蛋白 H3R2 的不对称二甲基化修饰,进而调控下游基因的表达,最终影响灰葡萄孢的形态建成和致病力。

综上所述,本研究明确了精氨酸甲基转移酶基因 *BcHMT2* 在灰葡萄孢中的关键生物学功能。*BcHMT2* 不仅调控灰葡萄孢的营养生长、菌丝形态和分生孢子发育,还对其致病力具有重要的正向调控作用。本研究不仅丰富了对灰葡

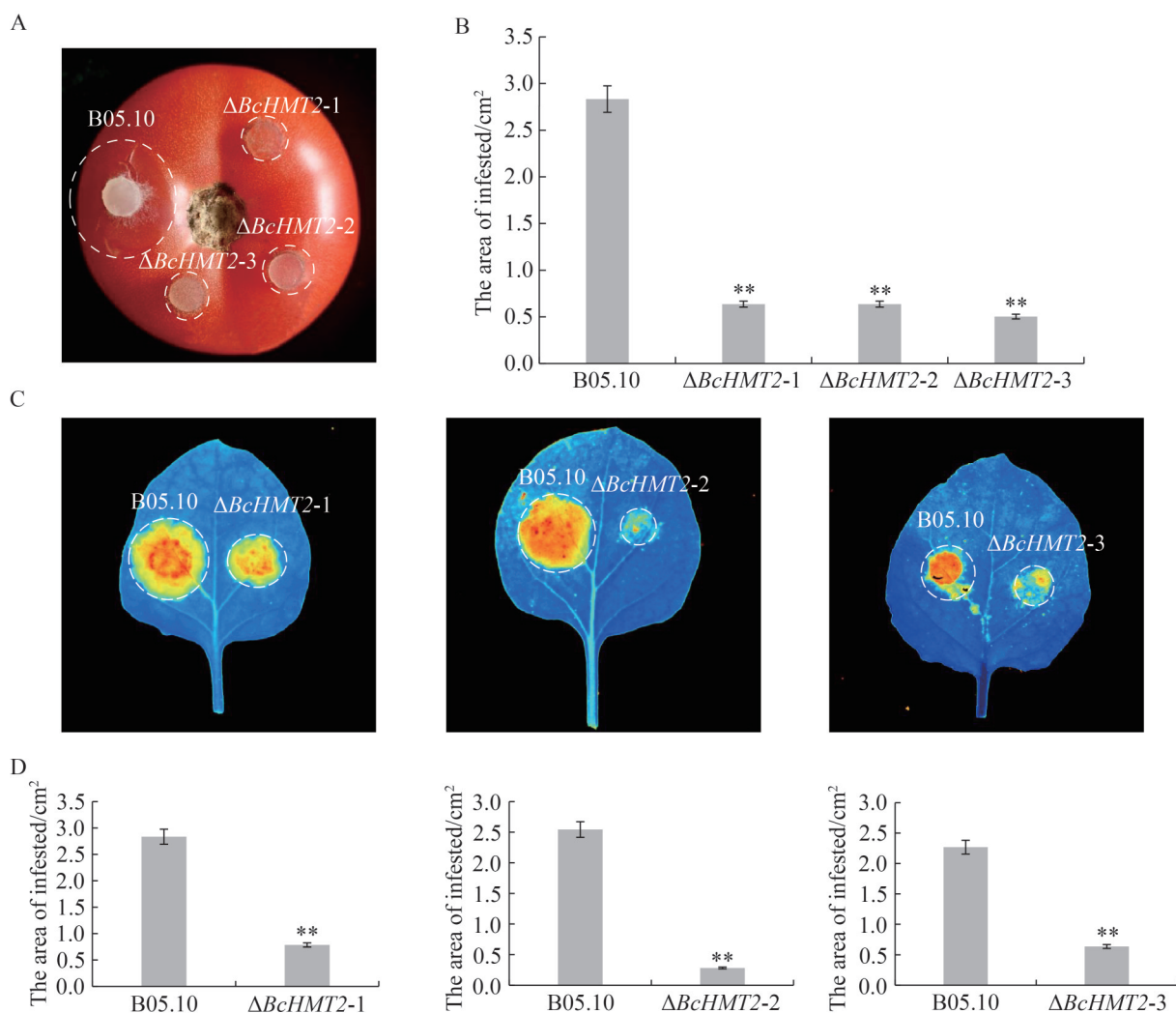


图7 突变体和野生型的致病力分析

Figure 7 Pathogenicity analysis of wild-type and mutant strains. A: Pathogenic symptoms on tomato fruits; B: Statistical analysis of lesion area on tomato fruits; C: Pathogenic symptoms on tobacco leaves; D: Statistical analysis of lesion area on tobacco leaves. \*\*:  $P < 0.01$ .

葡萄表观遗传调控机制的理解, 也为开发以PRMTs为靶标的新型杀菌剂提供了理论依据和潜在的基因资源。后续研究将进一步解析*BcHMT2*调控的下游靶基因网络及其在灰霉病防治中的应用潜力。

#### 作者贡献声明

李宇波: 试验操作、数据分析及文章撰写; 邓思琪: 数据分析及文章撰写; 董广恩: 部分试验操作、

数据收集及分析; 臧金萍: 提供经费支持; 司贺龙: 参与文章编辑和审阅; 董金皋: 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; 张康: 项目申领、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] Liu SM, Fu LY, Tan HH, Jiang J, Che ZP, Tian YE, Chen GQ. Resistance to boscalid in *Botrytis cinerea* from greenhouse-grown tomato[J]. Plant Disease, 2021, 105(3): 628-635.
- [2] 陈虎臣. 人参灰葡萄孢 BcSpd1 基因的功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.  
Chen HC. Function analysis of BcSpd1 gene from *Botrytis cinerea*[D]. Changchun: Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [3] 李俊, 宋娟娟, 周映君, 李国庆, 张静. 灰葡萄孢鞘脂代谢通路基因 Bcsph11 克隆及功能分析[J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1046-1052.  
Li J, Song JJ, Zhou YJ, Li GQ, Zhang J. Cloning and sequence expression analysis of sphingolipid metabolic pathway gene Bcsph11 in necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(4): 1046-1052 (in Chinese).
- [4] Schumacher J. Tools for *Botrytis cinerea*: new expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(6): 483-497.
- [5] 赵红霞, 苟萍. 灰葡萄孢菌致病机理研究进展[J]. 生物技术, 2014(1): 100-103.  
Zhao HX, Gou P. Advances in pathogenesis mechanism of *Botrytis cinerea*[J]. Biotechnology, 2014(1): 100-103 (in Chinese).
- [6] 陈宇春, 陈敏, 王其刚, 晏慧君, 唐开学, 邱显钦. 植物灰霉病及抗性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(15): 42-51, 63.  
Chen YC, Chen M, Wang QG, Yan HJ, Tang KX, Qiu XQ. Research progress of plant gray mold and resistance[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(15): 42-51, 63 (in Chinese).
- [7] Sui Z. Screening and functional analysis of pathogenic-related genes in *Botrytis cinerea*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [8] Plesken C, Weber RWS, Rupp S, Leroch M, Hahn M. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7048-7056.
- [9] Zhang J, Yang H, Yu QY, Wu MD, Yang L, Zhuang WY, Chen WD, Li GQ. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*[J]. Mycologia, 2016, 108(4): 682-696.
- [10] Leroch M, Plesken C, Weber RWS, Kauff F, Scalliet G, Hahn M. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 159-167.
- [11] Li ASM, Li FL, Eram MS, Bolotokova A, dela Seña CC, Vedadi M. Chemical probes for protein arginine methyltransferases[J]. Methods, 2020, 175: 30-43.
- [12] Moretton A, Baldwin RM, Cote J. Arginine methyltransferases as novel therapeutic targets for breast cancer[J]. Mutagenesis, 2015, 30(2): 177-189.
- [13] 王丽丽, 朱祯, 李霞. 精氨酸甲基转移酶及其生物学功能研究进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 39-44.  
Wang LL, Zhu Z, Li X. Advances in arginine methyltransferases and their functions[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(7): 39-44 (in Chinese).
- [14] Ahmad A, Dong YZ, Cao XF. Characterization of the PRMT gene family in rice reveals conservation of arginine methylation[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22664.
- [15] 王光辉. 禾谷镰刀菌 AMT1 基因的功能研究[D]. 西北农林科技大学, 2010.  
Wang GH. Functional characterization of AMT1 genes in *Fusarium graminearum*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010.
- [16] 吴立叶, 王国梁, 刘文德. 稻瘟病菌不同生长期蛋白精氨酸甲基转移酶基因的表达式分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 104-111.  
Wu LY, Wang GL, Liu WD. Expression analysis of protein arginine methyltransferase genes in *Magnaporthe oryzae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(6): 104-111 (in Chinese).
- [17] Li ZQ, Wu LY, Wu H, Zhang XX, Mei J, Zhou XP, Wang GL, Liu WD. Arginine methylation is required for remodelling pre-mRNA splicing and induction of autophagy in rice blast fungus[J]. New Phytologist, 2020, 225(1): 413-429.
- [18] Wang GH, Wang CF, Hou R, Zhou XY, Li GT, Zhang SJ, Xu JR. The *AMT1* arginine methyltransferase gene is important for plant infection and normal hyphal growth in *Fusarium graminearum*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38324.
- [19] Satterlee T, Cary JW, Calvo AM. RmtA, a putative arginine methyltransferase, regulates secondary metabolism and development in *Aspergillus flavus*[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155575.
- [20] McBride AE, Zurita-Lopez C, Regis A, Blum E, Conboy A, Elf S, Clarke S. Protein arginine methylation in *Candida albicans*: role in nuclear transport[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(7): 1119-1129.
- [21] Satterlee T, Entwistle S, Yin YB, Cary JW, Lebar M, Losada L, Calvo AM. *rmtA*-dependent transcriptome and its role in secondary metabolism, environmental stress, and virulence in *Aspergillus flavus*[J]. G3 Genes/Genomes/Genetics, 2019, 9(12): 4087-4096.