

从功能基因到生物学性状：大丽轮枝菌致病性形成的分子基础

田李¹ 李俊娇² 戴小枫² 张丹丹² 陈捷胤²

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 济宁 273165; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要：大丽轮枝菌为典型的土传维管束病原真菌，针对其致病相关基因的挖掘与功能解析一直是植物病理学研究的热点。大丽轮枝菌具有定殖维管束、“毒素”致萎、形成微菌核、种群分化多元化等特征，这些性状最终支撑或决定了病原对寄主的致病性基础。从进化角度来说，功能基因决定生物学性状。截至目前，在大丽轮枝菌中已鉴定出上百个功能基因；但针对其与病原的重要生物学性状和致病性之间的关系尚未系统阐述。为此，本文概述了大丽轮枝菌功能基因鉴定的发展历程，并以功能基因决定生物学性状为逻辑线条，重点梳理了功能基因与大丽轮枝菌重要生物学性状形成的关系，厘清了大丽轮枝菌致病性与决定重要生物学性状功能基因的关系。这些观点将为系统建立大丽轮枝菌重要生物学性状形成的功能基因网络，以及从功能基因决定生物学性状角度阐明大丽轮枝菌致病形成的分子基础提供理论支撑。

关键词：黄萎病；大丽轮枝菌；生物学性状；功能基因；致病性

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1205

From Functional Genes to Biological Characteristics : The Molecular Basis of Pathogenicity in *Verticillium dahliae*

TIAN Li¹ LI Jun-jiao² DAI Xiao-feng² ZHANG Dan-dan² CHEN Jie-yin²

(1. College of Life Science, Qufu Normal University, Jining 273165; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: *Verticillium dahliae* is a soil-borne vascular pathogen fungus, excavation and functional analysis of its disease-related genes has been a hotspot in plant pathology research. *V. dahliae* is characterized of adapting to the plant vascular niche, of inducing foliar wilting either by producing toxins or employing its secretome, of forming microsclerotia for long-term survival, and of evolving a variety of population structures, etc., thus these traits ultimately support or determine the pathogenic basis of pathogenicity to the host. Evolutionarily, functional genes determine the biological characteristics of a pathogen. Currently, hundreds of functional genes have been identified in *V. dahliae*, but their relationships to the key biological characteristics and how they contribute to its virulence have remained an unexplored topic. We systematically outlined the development process of identifying the functional genes in *V. dahliae*, focused on sorting the relationships between pathogenicity of *V. dahliae* and the functional genes determining its key biological traits based on the logic clue of functional genes determining biological traits, thus clarified the relationships between pathogenicity of *V. dahliae* and the functional genes determining its key biological traits. This exploration will provide the theoretical foundations for systematically constructing the functional gene networks of key biological characteristics in *V. dahliae* and explaining the molecular basis of pathogenicity and virulence in *V. dahliae* from the aspect of the functional genes determining its key biological traits.

Key words: Verticillium-wilt; *Verticillium dahliae*; biological characteristic; functional gene; virulence pathogenicity

收稿日期：2021-09-18

基金项目：国家自然科学基金项目（31972228, 31501588, 31970142），山东省自然科学基金（ZR2020MC115）

作者简介：田李，男，博士，副教授，研究方向：植物病理学；E-mail: biotian@qfnu.edu.cn

通讯作者：陈捷胤，男，博士，研究员，研究方向：植物病理学；E-mail: chenjieyin@caas.cn

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 引起的黄萎病是农作物生产上毁灭性的土传维管束真菌病害, 在全世界范围内广泛流行与传播, 危害棉花、马铃薯、茄子、番茄等 38 科 600 多种寄主, 造成严重经济损失^[1]。自 20 世纪初发现大丽轮枝菌以来, 科研工作者一直致力于病原学、流行规律、种群结构鉴定、为害机制等研究, 但由于大丽轮枝菌休眠结构—微菌核具有很强的抗药性、加上作物连作等问题, 导致从病原菌角度控制黄萎病的效果不甚理想^[1-2]。造成这一原因与大丽轮枝菌复杂的生物学特性和为害机制密切相关: 一是土壤中的大丽轮枝菌通过侵染植物根部进入维管束并定殖, 杀菌剂难以发挥作用^[1]; 二是作为土传病原, 大丽轮枝菌在土壤中具有极强的生命力, 形成的休眠结构微菌核可在土壤中存活 14 年以上, 并且具有极强的抗药性^[3]; 三是大丽轮枝菌种群演化机制复杂, 进化出了多元的种群结构^[4], 现有抗病品种极易发生抗性丢失, 而目前陆地棉中缺乏抗黄萎病的优良材料; 四是大丽轮枝菌进化出复杂的为害机制, 除依赖定殖外, 其分泌的“毒素”(狭义概念: 指病原分泌的胞外蛋白)可直接引起植物叶片萎蔫坏死, 最终造成寄主植物死亡^[5-6]。因此, 围绕大丽轮枝菌定殖维管束、微菌核形成、种群演化及“毒素”致萎等重要生物学性状与其致病性形成的关系研究^[4], 一直是大丽轮枝菌为害寄主研究的热点和焦点问题。特别是, 随着基因组解析和以基因敲除为代表的基因功能研究技术的发展^[7-10], 已鉴定出了一系列与大丽轮枝菌重要生物学特性相关的功能基因, 并聚焦这些基因的致病机制研究^[11]。这些研究结果极大推动了人们对大丽轮枝菌复杂致病机制的认识, 也为理解大丽轮枝菌重要生物学性状与致病性的形成关系提供了可能。

因此, 本文以当前鉴定的大丽轮枝菌重要生物学特性(定殖导管、“毒素”致萎、种群分化、寄主适应性、微菌核、育性等)功能基因为切入点, 系统梳理这些基因功能多元化与大丽轮枝菌致病性形成的关系, 为进一步理解和揭示大丽轮枝菌为害机制研究及靶向大丽轮枝菌重要生物特性的防治策略研发提供理论依据。

1 大丽轮枝菌功能基因挖掘的发展历程

1.1 传统策略: 大丽轮枝菌“毒素”组分鉴定的起始阶段

鉴于大丽轮枝菌为害严重, 20 世纪中叶以来, 科研人员依据大丽轮枝菌粗提液(胞外培养液)具有致萎的特性, 即开始了利用传统生理生化方法和蛋白分离纯化技术研究大丽轮枝菌的“毒素”组分(本文“毒素”主要指大丽轮枝菌分泌的胞外蛋白生物大分子), 并试图建立“毒素”致萎与致病性的关系。这一时期, 陆续鉴定到一些分泌到胞外的蛋白-脂质、蛋白-多糖复合体等致萎组分, 并发现这些组分与大丽轮枝菌致病性密切相关^[5]。如早在 1982 年 Buchner 等^[12]利用琼脂糖凝胶层析和高效液相色谱技术从大丽轮枝菌分泌液中分离得到一个高分子量的蛋白质脂多糖复合物, 该复合物具有的“毒素”活性并可导致易感寄主植物产生黄萎症状。类似的研究还包括从大丽轮枝菌粗提液中分离到 194 kD 脂多糖植物毒素蛋白^[13]和 65 kD 可诱导植物细胞合成植保素的糖蛋白^[14], 这些组分均可以引起植物叶片黄化萎蔫。国内科研工作者也开展了类似的研究, 如将大丽轮枝菌培养滤液浓缩后, 经过透析、DEAE 纤维素柱层析和琼脂糖凝胶亲和层析等步骤, 得到一个具有致萎活性峰的蛋白质脂多糖^[15]; 通过层析、双向电泳和 SDS 梯度电泳等手段, 分离到一个 26 kD 的糖蛋白, 可诱导海岛棉培养细胞中棉酚等倍半萜的合成并引起植物细胞死亡^[16]。尽管这个时期受限于技术原因, 科研工作者获得的致萎组分多为蛋白复合物, 并未鉴定出明确的功能基因信息, 但这些研究极大推动了人们对大丽轮枝菌“毒素”与致病性关系的理解, 时至今日仍为大丽轮枝菌效应子操控寄主免疫反应的为害机制研究提供了重要理论支撑。

1.2 T-DNA 随机插入技术: 从突变体到功能基因

上世纪末, 利用农杆菌介导的 T-DNA 随机插入法创建突变体成功应用于植物功能基因挖掘与鉴定工作^[17], 通过突变体功能性状鉴定和 T-DNA 插入位置关联的编码基因分析, 尤其是在基因组信息的支撑下, 即可很快确定出与目标性状关联的功能基因。这一研究策略成为当时鉴定功能基因最有效、

使用最广泛的手段，并很快成功应用于丝状真菌的功能基因鉴定工作^[18]。T-DNA 随机插入技术也被广泛应用于大丽轮枝菌功能基因的筛选和鉴定，国内外多个研究单位先后开展了 T-DNA 突变库构建工作，并鉴定出了一系列与致病相关的功能基因^[19-21]，如内切葡聚糖酶 VdEG-1^[21]、富含谷氨酸的蛋白质 VdGARP1^[22]、致病相关蛋白 VdPR1/3^[23-24]、转录因子 VdFTF1^[25] 等。因此，T-DNA 随机插入技术的应用极大推动了大丽轮枝菌重要生物学性状功能基因的鉴定与研究工作，至今仍有相关工作报道^[26-27]。

1.3 基因组学驱动的功能基因规模化鉴定

随着基因组学技术的快速发展，功能基因组研究策略很快被应用于大丽轮枝菌重要生物学性状功能基因的鉴定与研究。最先被鉴定的是来源于生菜的大丽轮枝菌 VdLs.17 基因组，发现了大丽轮枝菌通过扩张植物细胞壁降解酶家族来适应维管束寡营养环境的进化机制^[8]，这一研究为后续大量细胞壁降解酶的致病性功能研究奠定了基础。随后，通过来源番茄大丽轮枝菌 JR2（1 号生理小种）的基因组解析，揭示了染色体重排介导真菌无性繁殖的进化机制，并鉴定出 1 号生理小种无毒基因^[9, 28]。国内科研工作者也开展了大丽轮枝菌基因组研究工作，通过来源棉花大丽轮枝菌 Vd991 的基因组解析，阐明了大丽轮枝菌寄主广谱背景下优势适应棉花的基因组学基础，并成功解析了引起寄主棉花落叶性状的分子机制^[10, 26]。更重要的是，这些研究作为病原功能基因的鉴定和发掘提供了重要的参考基因组，支撑了功能基因组比较、同源基因注释与鉴定及基于转录组/蛋白组等功能基因鉴定工作。

上述参考基因组解析工作极大推动了大丽轮枝菌重要生物学性状的功能基因研究，并展示出了良好的发展前景。第一，通过功能基因组比较鉴定潜在重要性状功能基因，如功能基因组比较发现扩增的细胞壁降解酶家族成员在维管束适应性过程中发挥重要作用^[8]；通过不同菌株基因组的特有基因比较鉴定出 1 号和 2 号生理小种无毒基因以及落叶性状关联的功能基因^[26, 28-29]。第二，基因组解析为基于模式生物（酵母、稻瘟病菌等）已知功能基因的同源基因功能研究提供直接有效的靶点，如大丽轮

枝菌转录因子 VdSge1^[30]，丝裂原活化蛋白激酶信号通路成员^[31]。第三，基因组研究为基于转录组和蛋白组解析大丽轮枝菌重要生物学性状形成的基因网络研究和功能鉴定提供了重要支撑，如微菌核形成、紫外胁迫、侵染寄主应答等的转录分析^[32-34]，胞外蛋白质组致萎活性组分鉴定^[6]。第四，基因组解析工作为病原真菌特征特性功能基因研究提供了支撑，如依据病原菌操控免疫反应效应子具有小分子量富含半胱氨酸残基及胞外亚细胞定位的特征^[35-36]，可以基于生物信息分析策略全局鉴定出大丽轮枝菌潜在的效应子，并明确了操控寄主免疫反应的若干功能基因^[37]。总之，基因组学的发展提供了大量大丽轮枝菌候选基因；同时，病原真菌基因功能鉴定手段的进步，比如高效基因敲除^[8]、寄主诱导的基因沉默^[11]等，为这些候选致病基因的功能鉴定提供了研究体系，由此迎来了大丽轮枝菌功能基因的规模化鉴定。

2 大丽轮枝菌重要生物学特性功能基因鉴定情况

基于上述策略，科研工作者围绕大丽轮枝菌重要生物学特性功能基因鉴定开展了大量研究工作，并以植物病原菌致病性这一重要特征为主线，解析基因功能与致病性的关系。截至目前，已经报道了近百个大丽轮枝菌功能基因，并着重研究了这些基因与大丽轮枝菌重要生物学性状的关系，包括生长发育、微菌核形成、黑色素合成、维管束适应性、致病性等，这些基因影响或调控的生物学性状及与致病性的关系见表 1。其中，参与侵染结构（附着枝、侵染钉等）形态建成、分泌结构形成、维管束适应性（营养胁迫、氧化胁迫等）、“毒素”致萎、种群分化、微菌核/黑色素形成等相关功能的基因受到了广泛关注，并建立了多数基因与大丽轮枝菌致病性的关系（表 1）。相较于大丽轮枝菌全基因组，现阶段被鉴定并开展研究的功能基因仍占较小比例，且对于每个基因在病原菌生命周期中可能发挥的多重功能也欠缺全面认知，但这些研究进展仍为从大丽轮枝菌重要生物学性状及基因功能多元化的角度理解致病性形成的分子基础提供了重要理论支撑。

Table 1 Reported functional genes of major biological characteristics in *Verticillium dahliae*

		基因名称 Gene name	功能描述 Functional description	致病性 Pathogenicity											参考文献 Reference									
				棉花 Cotton	番茄 Tomato	莴苣 Lettuce	烟草 Tobacco	拟南芥 Arabidopsis	黄栌 Smoke tree	茄子 Eggplant	向日葵 Sunflower	穿透 Penetration	黏附 Adhesion	降解细胞壁 Degradation cell wall										
A	<i>VdMsb</i>	Transmembrane mucin	●				●				●												[38]	
	<i>VdSho1</i>	Synthetic high osmolarity sensitive (Sho1) sensor	●								●							●	●		●		[39]	
B	<i>VdPKAC1</i>	PKA catalytic subunit		●						●													[40]	
	<i>VGB</i>	G protein β subunit		●						●													[41]	
	<i>VdSsk2</i>	Mitogen activated protein kinase kinase kinases					●											●	●	●		●	●	[31]
	<i>VdPbs2</i>	Mitogen activated protein kinase kinase					●			●								●	●	●	●	●	●	[42]
	<i>VdHog1</i>	Mitogen-activated protein kinase								●								●	●	●			●	[43]
	<i>VdSte11</i>	Mitogen activated protein kinase kinase kinases					●											●	●	●		●	●	[31]
	<i>Vmk1</i>	Mitogen-activated protein kinase		●														●	●					[44]
	<i>VdSNF1</i>	Sucrose nonfermenting protein kinase		●						●		●			●				●					[45]
	<i>VdTOR</i>	Target of rapamycin	●												●									[46]
C	<i>VdSge1</i>	SIX gene expression 1		●							●				●	●	●			●				[30]
	<i>Vst1</i>	APSES transcription factor		●			●											●	●	●				[47]
	<i>VdCmr1</i>	Cluster-specific transcription factor				●	●											●	●					[48]
	<i>VdHapX</i>	bZip transcription factor								●								●	●	●			●	[49]
	<i>Vdpf</i>	Fungal-specific transcription factor	●				●											●	●	●	●			[50]
	<i>VdYap1</i>	Yeast AP-1-like protein								●									●				●	[51]
	<i>VdSkn7</i>	Two-component stress response regulator								●									●				●	[51]
	<i>VdFTF1</i>	Protein containing a fungal-specific TF domain	●												●	●	●							[25]
	<i>Som1</i>	Homolog of <i>S. cerevisiae</i> FLO8		●								●	●					●	●	●			●	[52]
	<i>Vta3</i>	Ortholog of RFX1/CRT1 of <i>S. cerevisiae</i>		●											●				●			●		[52]
	<i>Vta2</i>	Verticillium transcription activator of adhesion		●											●	●	●	●					●	[53]
	<i>Vta1</i>	Transcription activator of adhesion 1						●											●					[54]
	<i>VdMcm1</i>	MADS-box transcription factor					●			●				●				●	●	●	●		●	[55]
	<i>VdCrz1</i>	Calcineurin-responsive zinc finger								●									●	●			●	[56]
	<i>VdMsn2</i>	C2H2 transcription factor								●								●	●	●		●	●	[57]
	<i>VdAtf1</i>	bZIP transcription factor					●			●									●				●	[58]
	<i>Hac1</i>	bZIP transcription factor						●										●	●	●				[59]
	<i>VdCPC1</i>	Regulator control of amino acid biosynthesis		●														●	●					[60]
	<i>Vel1</i>	Velvet domain protein		●								●						●	●	●				[61]
D	<i>VdEG1</i>	Hydrolase family 12 proteins	●				●								●	●								[62]
	<i>VdEG3</i>	Hydrolase family 12 proteins	●				●								●	●								[62]
	<i>VdCUT11</i>	Cutinase	●												●	●								[63]
	<i>VdPEL1</i>	Pectate lyase	●				●								●	●								[64]
	<i>VdSCP27</i>	Secretory small cysteine-rich protein	●				●									●								[37]
	<i>VdSCP113</i>	Secretory small cysteine-rich protein	●				●									●								[37]
	<i>VdSCP126</i>	Secretory small cysteine-rich protein	●				●									●								[37]
	<i>VdECH</i>	Endochitinase														●								[65]
	<i>VdEIX3</i>	Ethylene-inducing xylanase														●								[66]

表 1 续表 Continued

基因名称 Gene name	功能描述 Functional description	致病性 Pathogenicity										穿透 Penetration	黏附 Adhesion	降解细胞壁 Degradation cell wall	免疫应答 Immune response	调控分泌 Secretory regulation	营养生长 Vegetative growth	产孢 Conidia production	微菌核 Microsclerotia	黑色素 Melanin	渗透压 Osmotic pressure	氧化胁迫 Oxidative stress	细胞壁完整性 Cell wall integrity	响应杀菌剂 Fungicide response	参考文献 Reference
		棉花 Cotton	番茄 Tomato	莴苣 Lettuce	烟草 Tobacco	拟南芥 Arabidopsis	黄杨 Smoke tree	茄子 Eggplant	向日葵 Sunflower																
	<i>VdNLP1</i>	●	●		●	●								●		●	●							[67–68]	
	<i>VdNLP2</i>	●	●		●	●								●		●	●							[67–68]	
	<i>VdIsc1</i>	●												●		●								[69]	
	<i>Vd2LysM</i>		●		●	●								●		●								[70]	
	<i>VdCP1</i>	●												●		●	●							[71]	
	<i>PevD1</i>	●	●		●									●		●	●							[72]	
	<i>VdSCP41</i>	●						●						●										[73]	
	<i>VdPDA1</i>	●	●							●				●		●								[74]	
	<i>VdSSEP1</i>	●												●		●								[75]	
	<i>VdCBM1</i>													●										[37]	
	<i>VdXyn4</i>	●												●	●	●								[76]	
	<i>Vd424Y</i>	●												●		●								[77]	
	<i>VdSCP7</i>	●												●		●		●						[78]	
	<i>VDAL</i>	●					●							●										[79]	
E	<i>VdAve1</i>		●			●								●		●								[28]	
	<i>Av2</i>		●																					[29]	
F	<i>VdSOD1</i>	●			●											●	●				●			[80]	
	<i>VdSOD3</i>	●			●											●	●				●			[81]	
	<i>VdSOD5</i>	●														●	●				●			[82]	
	<i>VdOCH</i>									●	●					●	●	●				●		[83]	
	<i>VdASP F2</i>	●														●		●	●	●	●			[84]	
	<i>GT2</i>			●	●											●				●				[8]	
	<i>VDH1</i>		●													●	●	●						[85]	
	<i>VdPL3.1</i>	●												●										[6]	
	<i>VdEG-1</i>			●										●				●						[21]	
	<i>VdSSP1</i>	●												●			●							[86]	
G	<i>VdCSIN1</i>	●								●						●	●	●						[87]	
	<i>VdNoxB</i>	●								●						●			●					[88]	
	<i>VdPls1</i>	●								●						●			●					[88]	
	<i>VdHP1</i>	●								●							●		●					[89]	
	<i>VdSep5</i>	●								●					●	●								[90]	
	<i>VdSec22</i>	●													●	●			●				[90–91]		
	<i>VdSyn8</i>	●													●	●			●					[90]	
G	<i>VdExo70</i>	●													●	●								[90]	
	<i>VdMyo5</i>	●					●			●				●	●	●		●						[92]	
	<i>VdSso1</i>	●													●	●								[91]	
H	<i>VdPKS</i>	●														●	●	●	●					[93]	
	<i>Vayg1</i>	●									●	●				●			●	●				[94]	
	<i>VdCYP1</i>	●														●								[95]	
	<i>VdNPS</i>	●															●	●			●			[96]	

表 1 续表 Continued

基因名称 Gene name	功能描述 Functional description	致病性 Pathogenicity										穿透 Penetration	黏附 Adhesion	降解细胞壁 Degradation cell wall	免疫应答 Immune response	调控分泌 Secretory regulation	营养生长 Vegetative growth	产孢 Conidia production	微菌核 Microsclerotia	黑色素 Melanin	渗透压 Osmotic pressure	氧化胁迫 Oxidative stress	细胞壁完整性 Cell wall integrity	响应杀菌剂 Fungicide response	参考文献 Reference
		棉花 Cotton	番茄 Tomato	莴苣 Lettuce	烟草 Tobacco	拟南芥 Arabidopsis	黄栌 Smoke tree	茄子 Eggplant	向日葵 Sunflower																
I	<i>VdBr1</i>	Ubiquitin ligase enzyme	●						●			●					●	●							[97]
	<i>VdDf1 – VdDf7</i>	Defoliation-associated genes	●												●										[10, 26]
	<i>VdRACK1</i>	Gβ-like/RACK1 protein family	●						●			●					●	●	●	●					[98]
	<i>VdGLO1</i>	Glyoxalase I gene homologue			●												●	●							[99]
	<i>VdATG8</i>	Autophagy-related gene					●										●	●							[100]
	<i>VdPRI</i>	Pathogenicity-related gene 1	●						●			●					●	●	●						[23]
	<i>Vdhex1</i>	Peroxisomal protein						●	●			●					●	●	●	●	●	●	●		[101]
	<i>VdAK</i>	Adenylate kinase				●														●					[102]
	<i>VdPR3</i>	Pathogenicity related gene 3	●										●				●	●	●						[24]
	<i>VdNRS/ER</i>	Nucleotide-rhamnose synthase/epimerase-reductase		●		●											●	●		●		●			[103]
	<i>VdRac1</i>	Small GTPase	●				●		●			●					●	●							[104]
	<i>Dim2</i>	DNA methyltransferase		●													●	●		●	●		●		[105]
	<i>STT3</i>	Oligosaccharyl transferase subunit				●										●	●	●							[106]
	<i>VdCYC8</i>	CYC8 glucose repression mediator protein	●														●	●	●	●					[107]
	<i>VdNUC-2</i>	Key regulator of phosphate responsive	●														●	●	●			●			[108]
	<i>VdPLP</i>	Patatin-like phospholipase				●			●			●					●	●	●			●			[109]
	<i>VdThi</i>	Thiamine transport protein				●			●			●					●	●				●			[110]
	<i>VdMAT1-1-1</i>	Mating-type gene																							[111]
	<i>VdMAT1-2-1</i>	Mating-type gene																							[111]
	<i>NoxA</i>	NADPH Oxidase A						●	●			●					●		●		●		●		[112]
	<i>VdNop12</i>	RNA binding protein	●						●			●					●	●				●			[113]
	<i>VdDpb4</i>	Homologous component of the yeast ISW2 complex	●						●			●					●	●	●			●			[114]
	<i>VdIsu2</i>	ATP-dependent chromatin-remodeling factor	●														●		●			●			[114]
	<i>VdOGDH</i>	α-oxoglutarate dehydrogenase	●														●	●	●			●			[115]
	<i>VdTHI20</i>	Thiamine biosynthesis gene				●			●			●					●	●							[116]
	<i>VdICSH</i>	Isochorismatase hydrolase		●					●					●			●	●	●						[117]

注:最左侧字母代表基因分类,分别是 A 跨膜受体, B 蛋白激酶, C 转录因子, D 效应蛋白, E 无毒蛋白, F 其他分泌蛋白, G 侵染结构与分泌系统, H 次级代谢, I 其他。红色圆圈代表基因正向调控该性状;绿色圆圈代表基因不参与调控该性状;灰色圆圈代表基因负向调控该性状

Note : The letters on the left side of the table represent gene classification. “A” represents transmembrane receptor coding genes, “B” represents protein kinase coding genes, “C” represents transcription factor coding genes, “D” represents effector protein coding genes, “E” represents avirulence protein coding genes, “F” represents other secretory protein coding genes, “G” represents infection structure and secretion system protein coding genes, “H” represents secondary metabolism related protein coding genes, and “I” represents other protein coding genes, respectively. The red circle indicates that the gene positively regulates the biological characteristic ; the green circle indicates that the gene is not involved in the regulation of this biological characteristic ; the gray circle indicates that the gene negatively regulates the biological characteristic

3 侵染结构形态建成与维管束适应相关基因

大丽轮枝菌侵染循环起始于微菌核在土壤中萌发（一般认为是根系分泌物诱导），继而通过菌丝生长接触并吸附在寄主根表面；为实现侵染，菌丝开始形成特化的侵染结构附着枝、并产生侵染钉以刺

穿根部表皮细胞，逐步侵入并最终到达导管；在导管中，侵染的菌丝再次萌发产生分生孢子^[5]。在此过程中，大丽轮枝菌通过多种策略来感知寄主信号萌发侵染、适应维管束的胁迫和寡营养环境并实现定殖和扩繁，最终引起导管变褐、植株黄化萎蔫等

黄萎病症状。

3.1 侵染过程信号感应及信号转导相关基因

虽然早期研究没有发现大丽轮枝菌侵染寄主时是否会形成与稻瘟病菌附着胞类似的侵染结构——附着枝和侵染钉，但近年研究发现，大丽轮枝菌在紧密接触寄主根部表皮细胞时也会分化形成特化的顶端膨大的菌丝分枝，被称为附着枝^[88]。有研究发现大丽轮枝菌膜穿透诱导基因 *VdCSIN1* 通过 cAMP 介导的信号通路调控附着枝形成^[87]；跨膜受体 *VdMsb*^[38] 以及转录因子 *Som1*、*Vta3*^[52] 和 *VdMcm1*^[55] 也影响了大丽轮枝菌的附着能力。此外，大丽轮枝菌黏附转录激活子 *Vta2* 可以通过调控黏附素蛋白以及分泌性蛋白的表达，促进菌丝黏附在寄主表面^[53]。进一步研究发现，附着枝特异表达 NADPH 氧化酶催化亚基 *VdNoxB* 和膜蛋白 *VdPls1* 基因，二者介导超氧化物（ROS）产生并引起胞内钙离子（Ca²⁺）内流，促使转录因子 *VdCrz1* 进入细胞核而诱导下游基因表达，进一步调控侵染钉的发育和形成，最后侵染钉刺穿植物根细胞表皮开启其侵染过程^[88]。另一方面，研究发现侵染钉形成过程中，细胞骨架组分 *Septin5* 和 F-actin 以成环的形式衍化成菌丝颈环，与寄主细胞表面形成紧密的互作界面，促使蛋白高效分泌到寄主细胞表面或转运至寄主细胞内，表明大丽轮枝菌附着枝除发挥附着功能外，还形成了独特的分泌结构以促进蛋白分泌，达到成功侵染寄主的目的^[90]。针对蛋白分泌过程中膜泡转运蛋白的功能研究也证实了菌丝颈环结构参与了蛋白外泌的过程，膜泡转运蛋白 *VdSec22*、*VdSso1*、*VdSyn8* 和胞吐体亚基 *VdExo70* 均参与了分泌蛋白的胞内转运，包括效应子和植物细胞壁降解酶，其缺失后均可导致效应子滞留在菌丝颈环内^[90-91]。此外，有研究发现肌球蛋白家族成员 *VdMyo5* 参与了大丽轮枝菌菌丝顶端的分泌囊泡转运，其缺失严重影响了包括活性氧降解相关蛋白和细胞壁修饰蛋白的分泌^[92]。不言而喻，因大丽轮枝菌侵染过程信号感应及信号转导相关基因同时影响了病原对寄主的附着能力及许多致病相关因子转运至寄主细胞的能力，它们缺失后对寄主均表现出不同程度的致病力缺陷。

3.2 环境胁迫适应相关基因

在维管束环境中，大丽轮枝菌的定殖与扩繁须应对渗透压、氧化等各种胁迫。比较基因组分析发现，维管束病原真菌（大丽轮枝菌、苜蓿轮枝菌和尖孢镰刀菌）相较其他生态位病原真菌编码了部分特异基因，这些基因可能参与了病原对维管束环境的适应^[8]。以大丽轮枝菌葡聚糖葡萄糖基转移酶基因 *GT2* 为例，该基因可能通过参与调节植物细胞周质葡聚糖的代谢，导致导管渗透压力降低，维持病原的正常定殖与扩繁，该基因缺失后显著降低了对烟草的侵染和定殖能力^[8]。另外，大丽轮枝菌膜丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路中蛋白激酶 *VdSsk2*^[31]、*VdPbs2*^[42] 和 *VdHog1*^[43] 正向调控了病原对渗透压胁迫的适应性，受体蛋白 *VdSho1* 则与细胞膜通透性有关^[39]。这些基因均不同程度上参与了病原对维管束逆境胁迫的适应性，缺失后均会引起菌株致病力下降。

另一方面，活性氧（ROS）是寄主防卫病原侵染的重要策略，大丽轮枝菌在突破植物细胞屏障和定殖维管束导管中同样需要面对寄主活性氧的攻击^[118]。目前研究发现，与植物维管束真菌尖孢镰刀菌类似^[11]，大丽轮枝菌主要通过分泌超氧化物歧化酶（superoxide dismutases, SODs）至胞外行使寄主活性氧清除功能，从而促进病原菌对寄主的侵染，基因缺失后致病力均显著下降^[80-82]。有趣的是，大丽轮枝菌可能为逃避寄主的防卫反应，利用了不同的策略将 SODs 转运至细胞外，如带有信号肽结构的 *VdSOD5* 依赖于经典的内质网-高尔基体通路分泌至胞外；而 *VdSOD1* 和 *VdSOD3* 不具有信号肽，其分泌依赖于非经典分泌系统的关键调控蛋白 *VdGRASP*（Golgi reassembly stacking protein）^[80-82]。类似地，蛋白激酶 *VdPbs2*^[42] 和多个转录因子 *VdHapX*^[49]、*VdYap1*^[51]、*VdSkn7*^[51]、*Som1* 和 *Vta2*^[52] 均可通过正向调控大丽轮枝菌对氧化胁迫的适应性，提升病原在寄主维管束的定殖能力和侵染寄主的致病力。

3.3 营养物质利用与维管束定殖

维管束环境营养极为贫瘠，大丽轮枝菌如何适

应维管束寡营养环境一直是研究的热点问题。基因组学研究为理解这一机制提供了可能。比较基因组研究发现,与其他非维管束病原真菌相比,大丽轮枝菌基因组进化出了复杂的植物细胞壁降解网络,共编码了 504 个降解植物细胞壁的碳水化合物酶类,其中果胶裂解酶(包括 PL1、PL3、PL9 家族)家族成员相比于其他植物病原真菌发生了显著扩增^[8],这与侵染和定殖过程中需要降解富含果胶的寄主细胞壁、进入导管和在导管内繁殖的功能需求呈正相关。因此,大丽轮枝菌通过植物细胞壁降解酶基因家族扩张并分泌至胞外发挥功能,是其适应维管束寡营养环境的重要策略。这种作用进一步体现在大量细胞壁降解酶参与了大丽轮枝菌的侵染与定殖过程,并显著影响了病原的致病力。如糖苷水解酶 VdSSP1 通过降解植物细胞壁组分参与大丽轮枝菌致病性^[86];纤维素酶 VdEG-1 被证明在寄主早期定殖木质部发挥重要功能^[21];分泌型果胶酶 VdPL3.1 参与了果胶的降解和利用,缺失突变体对寄主的致病力显著下降^[6]。此外,多个参与细胞壁降解酶调控的信号因子也参与了大丽轮枝菌对植物细胞壁组分的降解和利用,在侵染和维管束定殖过程中发挥作用,包括蔗糖非发酵蛋白激酶 VdSNF1^[45]、转录因子 VdFTF1^[25]、雷帕霉素靶蛋白 VdTOR^[46]等。

大丽轮枝菌在维管束寡营养环境中对氮源的吸收和利用在侵染和定殖过程中也发挥重要作用^[58]。转录组分析发现大丽轮枝菌存在不同的调控机制来实现对氮(铵)和硝酸盐的区别利用,如 MADS-box 转录因子 VdMcm1^[55]、碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子 VdHapX 等均参与这一过程^[49]。研究还发现,另一个 bZIP 转录因子 VdAtf1 参与了对活性氮的应答,并调控了大丽轮枝菌胞内硝酸和铵的代谢平衡^[58]。此外,大丽轮枝菌通常会启动自身氨基酸的合成通路以应对维管束缺乏氮源的环境胁迫^[58]。这一作用过程在近缘种长孢轮枝菌中已得到证实,其转录因子 VICPC1 参与了氨基酸的合成,缺失后其在氨基酸缺乏的环境中生长显著抑制^[60]。类似地,这些功能基因参与大丽轮枝菌适应维管束寡营养环境的重要生物学过程,决定了大丽轮枝菌在维管束的定殖和扩繁能力,必然与大丽轮枝菌的致病性显著相关,缺失后均不同程度丧失了对寄主的致病力。

总之,大丽轮枝菌通过一系列信号感应及转导,特化形成的附着枝和侵染钉等结构可以使其成功侵入寄主并最终到达导管,同时分泌大量的效应蛋白和细胞壁降解酶类,发挥致病功能;另外,通过多种策略来适应维管束的环境胁迫和寡营养条件实现菌体扩繁。上述功能基因构成了大丽轮枝菌维管束定殖和适应的分子基础。

4 “毒素”致萎组分及操控寄主免疫反应

大丽轮枝菌成功侵染寄主后,通常会引起寄主叶片黄化、萎蔫、褪绿等典型黄萎病发病症状。这一病症的成因主要有“毒素”和“堵塞”两种学说^[5]。“毒素”学说认为是大丽轮枝菌分泌的毒性蛋白诱发了寄主叶片黄化萎蔫^[12]，“堵塞”学说则认为大丽轮枝菌在维管束中大量繁殖以及寄主防卫反应产生的多糖(侵填体、木栓质等)堵塞导管,导致水分和养分运输困难而造成叶片萎蔫黄化^[119]。实际上,因大丽轮枝菌分泌蛋白在菌体繁殖和诱发寄主反应过程中均发挥了重要作用^[63-64],两种学说可能存在关联,但二者之间的交互机制尚不清楚。近年来,随着大量分泌蛋白组分及其功能被鉴定和报道,“毒素”学说在大丽轮枝菌对寄主致病性的贡献日渐清晰;同时,“毒素”组分操控寄主免疫反应的功能也被大量研究和报道。

4.1 “毒素”致萎组分

针对大丽轮枝菌为害机制的研究,科研工作者很早就注意到其可以产生植物毒素而引起寄主细胞死亡^[120]。随后,围绕大丽轮枝菌引起寄主细胞死亡和诱发叶片黄化萎蔫的组分开展了系列研究,并基于传统生理生化方法从大丽轮枝菌胞外培养液中鉴定了一批具有诱导植物叶片黄化萎蔫的组分^[13-16]。这些组分均可以不同程度引起类似病原侵染诱发的植物叶片黄化萎蔫症状,并逐渐形成了大丽轮枝菌为害寄主的“毒素”致萎学说。随着分子生物学技术的发展,科研工作者通过构建表达序列标签文库筛选出表达坏死和乙烯诱导蛋白的同源基因 *VdNEP* (*V. dahliae* Necrosis- and ethylene-inducing peptide),并证实该基因编码蛋白为“毒素”致萎的关键组分,可以诱导植物叶片黄化萎蔫^[121]。随后,国内外科研工作者先后通过基因组学驱动研究发现大丽轮

枝菌坏死和乙烯诱导蛋白具有 8 个成员，并证明其中两个成员 VdNLP1 (*V. dahliae* NEP1-like proteins) 和 VdNLP2 (同上述 VdNEP) 具有致萎功能^[67-68]。新近研究发现，大丽轮枝菌还可以分泌木聚糖酶 VdXyn4 (*V. dahliae* xylanase family member 4) 并操控寄主免疫反应而发挥毒性功能^[76]。有趣的是该基因可以特异诱导维管束细胞萎蔫死亡，这有可能为下一步揭示大丽轮枝菌“毒素”和“堵塞”两种学说之间的关系提供研究切入点^[76]。新近有研究发现，大丽轮枝菌效应子 VDAL (*Verticillium dahliae*-secreted Asp f2-like) 处理棉花子叶后同样可以引起萎蔫症状，表现出毒性功能^[79]。然而，“毒素”组分远非如此简单，对大丽轮枝菌胞外蛋白鉴定发现，共有 271 个蛋白在诱导棉花子叶黄化萎蔫过程中丰度显著提高^[6]，暗示在大丽轮枝菌胞外蛋白中存在其他“毒素”致萎组分并可能通过协作发挥毒性功能，后续亟须进一步深入研究。

4.2 诱导寄主免疫反应相关基因

植物经典免疫反应理论认为，植物通过识别病原效应子激发免疫反应以阻止病原的侵染，病原进一步分泌效应子抑制寄主免疫反应以促进侵染，二者在长期的互作中呈现出寄主抗性和病原侵染性的竞争进化^[122-123]。在基因组学研究驱动下，大量大丽轮枝菌分泌型蛋白被鉴定出来并发现它们多数遵循植物与病原互作的免疫反应理论，通过操控寄主免疫反应实现病原菌的毒性功能。

大丽轮枝菌被寄主识别并诱导免疫反应的效应子已被广泛报道。在基因组学驱动下，基于某些效应子通常具备小分子量富含半胱氨酸残基的特征 (small cysteine-rich proteins, SCPs)，发现大丽轮枝菌基因组编码 100 多个潜在的 SCPs 类效应子^[8, 10]。通过烟草瞬时表达规模化筛选，发现至少有 3 个成员 (VdSCP27、VdSCP113 和 VdSCP126) 可作为质外体效应子被寄主识别并诱导免疫反应，并且其中 2 个成员 (VdSCP27/VdSCP126) 在侵染寄主过程中还发挥了毒力功能^[37]。另外一项独立研究显示，定位于细胞核的 VdSCP7 可激活寄主水杨酸和茉莉酸信号通路，负向调控大丽轮枝菌致病性^[78]。大丽轮枝菌激发子 PevD1 可诱导寄主细胞坏死^[72]，在棉花中

可与抗病蛋白 GhPR5 互作，抑制 GhPR5 的抗真菌活性^[124]，在烟草中则与富含天冬酰胺蛋白 NbNPR1 互作来调控植物抗毒素倍半萜的合成^[125]；新近通过模式植物拟南芥研究发现 PevD1 还可以靶向植物衰老调控核心转录因子 ORE1，从而促进叶片衰老，这与病原定殖后期主要通过吸收衰老叶片和茎的营养并进入腐生阶段相吻合^[126]。此外，作为攻击寄主植物的“先锋”——细胞壁降解酶自身或其降解产物也通常被寄主识别而引起免疫反应。大丽轮枝菌分泌型糖基水解酶 12 家族 (glycoside hydrolase 12, GH12) 的纤维素内切酶 VdEG1 和 VdEG3 (不依赖于酶活) 可作为 PAMPs 被寄主识别而诱导烟草免疫反应^[62]。而角质酶 VdCUT11 和果胶酶 VdPEL1 则依赖于酶活引发烟草和棉花细胞坏死^[63-64]，这一作用可能是通过二者的酶解功能，由降解产物来识别寄主受体而引发免疫反应。大丽轮枝菌木聚糖酶 (糖苷水解酶 11 家族蛋白) 也有类似功能：VdEIX3 (*V. dahliae* ethylene-inducing xylanase 3) 在烟草中表现出免疫诱导活性，可被烟草 PRR 类表面受体 NbEIX2 识别激发下游的免疫反应^[66]；定位于寄主细胞核的木聚糖酶 Vd424Y (即先前报道的 VdXyn4) 也可诱发寄主免疫反应^[77]；除了引起植物叶脉、叶柄等维管束细胞坏死外，还发现 VdXyn4 具有操控茉莉酸信号介导的免疫反应^[76]。尽管上述细胞壁降解酶类在与寄主互作过程中被识别激发了免疫反应，但多数效应子缺失后均不同程度影响了病原的致病力^[64, 76]。因此，大丽轮枝菌侵染寄主过程中分泌了相当数量的效应子参与二者互作并发挥毒性功能。

4.3 抑制寄主免疫反应相关基因

病原侵染寄主过程中不可避免会激发寄主的免疫反应，而利用效应子抑制寄主免疫反应则是病原实现对寄主成功侵染的重要策略^[127]。类似地，大丽轮枝菌也可以外泌大量的效应子来抑制寄主的免疫反应，促进病原对寄主的成功侵染^[128]。对大丽轮枝菌小分子量富含半胱氨酸蛋白 (VdSCPs) 的筛选发现，至少有 7 个 VdSCPs 能够抑制多种效应子激发的寄主免疫反应^[37]。另一项独立研究显示，小分子量富含半胱氨酸蛋白 VdSCP41 可以转运到寄主细胞核内，通过直接与植物钙调素结合蛋白家族重要

免疫转录因子 CBP60g 和 SARD1 相结合, 干扰其转录因子活性从而抑制植物免疫相关基因的表达^[73]。大丽轮枝菌纤维素结合结构域蛋白 VdCBM1 也属于小分子量富含半胱氨酸蛋白, 可以抑制多种 PAMPs (包括 VdEG1/3, VdCUT11 和 VdSCP27/113/126 等) 所诱导的寄主免疫反应^[37]。CBM1 可以通过偶联细胞壁降解酶结构域来操控免疫反应, 如糖苷水解酶 VdEG3 因其 GH12 结构域偶联了 CBM1 (GH12-CBM1) 而导致诱导免疫反应能力显著下降^[62]; 不仅如此, 含有 CBM1 结构域的家族在大丽轮枝菌基因组中发现了显著扩张^[8], 且多数 CBM1 结构域具有抑制免疫反应功能^[129], 表明大丽轮枝菌可能利用 CBM1 结构来抑制细胞壁降解酶发挥作用过程中可能诱发的寄主免疫反应, 从而促进病原对寄主的成功侵染, 这可能也与大丽轮枝菌半活体营养的特性密切相关。几丁质介导的免疫反应是病原与寄主争夺的重要“阵地”, 大丽轮枝菌效应子在该过程中同样发挥了重要作用。大丽轮枝效应蛋白 Vd2LysM 可以通过竞争性结合几丁质寡糖, 阻断几丁质和植物膜受体结合以抑制几丁质诱发的免疫反应^[70]; SnodProt 家族蛋白 VdCP1 也可以结合几丁质, 通过对大丽轮枝菌细胞壁几丁质成分保护作用实现其致病功能^[71]; 丝氨酸蛋白酶 VdSSEP1 在质外体空间抑制寄主几丁质酶 Chi28 对病原菌细胞壁的降解从而降低寄主对大丽轮枝菌的免疫识别^[75]; 而效应子 VdPDA1 则通过乙酰化酶活性对几丁质寡糖进行修饰, 产生不具免疫诱导活性的壳聚糖, 从而逃避了寄主对大丽轮枝菌的识别^[74]。此外, 非典型分泌蛋白 (缺乏信号肽) 异分支酸酶 VdIsc1 则可以转运至寄主胞质中, 通过降解寄主水杨酸的前体物质异分支酸进而抑制寄主水杨酸介导的免疫反应^[69]。总之, 在病原与寄主互作过程中, 大丽轮枝菌通过大量的效应子来操控寄主免疫反应, 使寄主植物处于易感状态, 协助发挥毒性功能并促进病原对寄主的成功侵染。

5 种群结构分化相关基因

普遍认为, 大丽轮枝菌是严格的无性繁殖真菌, 但研究发现其具有复杂的种群结构, 依据生理小种划分为 3 个种群 (1 号、2 号和 3 号), 依据寄主病症划分为 2 个种群 (落叶型 / 非落叶型)、依据遗传

多样性或者营养亲和性划分为 6–8 个种群, 而基于配子型分子证据则可以划分为 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 配子型^[4]。这些种群分化往往和病原对寄主的致病力显著关联, 因此, 挖掘鉴定决定种群形成的遗传基础及关键功能基因一直是揭示大丽轮枝菌种群结构演化及其对寄主适应性机制的重大挑战。

5.1 生理小种无毒基因

早在 1951 年, 科研工作者即发现番茄存在的 *Ve* 位点, 可以介导其对部分大丽轮枝菌 (定义为 1 号生理小种) 的抗性, 而其他类型病原被定义为 2 号生理小种 (传统定义)^[1]; 同时, 针对 1 号生理小种的抗病基因也于本世纪初被鉴定并进行了功能确证^[28, 130]。然而, 在很长的一段时间, 由于未发现针对 2 号生理小种的抗病材料, 2 号生理小种的遗传背景一直不清楚。直至 2017 年, 科研工作者通过番茄资源的大规模筛选鉴定出可以抗部分 2 号生理小种的番茄材料 (单显性位点 *V2*), 由此进一步将 2 号生理小种划分为现今的 3 个生理小种^[131]。在生理小种无毒基因克隆方面, 借助于基因组学技术优势, 通过 1 号和 2 号生理小种全基因组重测对参考基因组 (JR2, 1 号生理小种) 全基因组覆盖分析, 鉴定出了仅存在于 1 号生理小种的特异片段, 并结合转录组分析鉴定出 1 号生理小种无毒基因 *Ave1*; 遗传学验证证实 *Ave1* 是 1 号生理小种的无毒基因, 该基因缺失可以侵染含有 *Ve1* 基因的番茄, 而不能侵染不含 *Ve1* 基因的番茄^[28]。采用类似的策略, 科研工作者很快也鉴定出了大丽轮枝菌 2 号生理小种特异遗传变异并明确了无毒基因 *Av2*^[29]。关于 3 号生理小种的遗传学证据及无毒基因尚未被发现和报道。

5.2 寄主适应性: 落叶性状功能病基因

虽然大丽轮枝菌寄主极为广泛, 但在侵染寄主中存在交互致病性 / 寄主适应性, 即存在不同寄主来源的大丽轮枝菌对分离寄主表现出较强致病力的趋势^[132]。决定这一适应性的遗传变异的分子基础直到近年基于基因组学研究才被发现: 通过来源于番茄、生菜和棉花的 3 株大丽轮枝菌全基因组比较分析发现, 每个基因组中均含有特异的基因组区段; 其中来源于棉花的大丽轮枝菌 Vd991 基因组的一个

区段 (G-LSR2) 中的 7 个基因仅在其侵染棉花时高表达, 而侵染番茄和生菜则低表达或者不表达, 缺失这 7 个基因后对寄主棉花的致病力显著下降, 而对番茄和生菜的致病力无影响, 是决定大丽轮枝菌对寄主棉花适应性的功能基因^[10]。进一步通过群体基因组学研究发现, G-LSR2 仅存在于落叶型菌株中, 在非落叶型菌株中完全缺失。通过精细表型鉴定发现, 上述 7 个基因 (*VdDf1* - *VdDf7*) 是决定大丽轮枝菌引起寄主落叶性状的功能基因, 并发现其中 *VdDf5* 和 *VdDf6* 是其中两个关键功能基因, 它们参与化合物 *N*- 酰基乙醇胺的合成和将其转运至寄主, 引起寄主植物激素失衡并增加易感性, 最终引起寄主叶片脱落^[26]。有意思的是, *VdDfs* 与棉花枯萎病菌基因高度同源, 分子进化分析支持这些基因是由棉花枯萎病菌水平转移至大丽轮枝菌^[26]。因此, 这些研究暗示, 大丽轮枝菌可能通过基因水平转移从同一生态位的维管束病原真菌—棉花枯萎病菌中获得基因, 逐渐形成了对寄主棉花的优势适应性, 并最终进化出引起寄主棉花落叶的性状。

5.3 其他种群结构分化相关基因

针对大丽轮枝菌其他种群结构分化的遗传变异基础及功能基因研究报道较少。在交配型上, 虽然普遍认为大丽轮枝菌为严格的无性繁殖真菌, 但仍然保留着两种配子型 (*MATI-1* 和 *MATI-2*) 的遗传证据^[133], 并发现大丽轮枝菌以 *MATI-2* 配子型为优势种群^[134]。基于基因组注释, 科研工作者很快获得了决定两种配子型育性的功能基因 *VdMATI-1-1* 和 *VdMATI-2-1*, 并通过基因选择压力分析及其他育性相关基因功能活性鉴定, 推测大丽轮枝菌祖先种存在有性生殖能力或者为“隐性”有性世代^[111]。然而决定育性的功能基因 *VdMATI-1-1* 和 *VdMATI-2-1* 是否和致病性有关尚不清楚。作为无性繁殖真菌, 科研工作者利用遗传多样性分析开展了种群结构研究, 多数结论认为大丽轮枝菌已分化为 6–8 个无性系^[135–136], 且同基于营养亲和性鉴定的种群结构 (4–8 个营养亲和型) 相关性较强^[135, 137–138]。尽管有限的种群结构与分离寄主关联分析研究认为, 无性系 / 营养亲和性种群分化与病原对寄主的致病性无显著相关^[135–136], 但决定这些种群分化的遗传基础及其

与病原的致病性关系仍不清楚, 有待进一步深入研究。

6 微菌核形成和黑色素合成相关基因

大丽轮枝菌完成侵染循环后形成休眠结构微菌核并重新进入土壤环境^[139]。微菌核是由大丽轮枝菌外层菌丝细胞膨大、分泌出黑色素填充细胞间隙而形成的休眠结构, 具有很强的抗逆性, 能保护大丽轮枝菌度过低温等严酷的环境, 在适合条件下 (如寄主根系分泌物) 重新诱导萌发并开始新的侵染循环^[5]。因此, 感应外界环境信号 (如营养条件) 对大丽轮枝菌形成微菌核或微菌核重新萌发均发挥至关重要的作用。基于这一原因, 科研工作者更多关注了信号感应和传导元件对微菌核形成的调控机制研究。确实如此, MAPK 信号通路的许多相关组件 (*VdHog1*、*VdPbs2*、*VMK1*、*VdSsk2* 和 *VdSte11* 等) 均调控了微菌核的形成, 缺失这些基因后导致微菌核形成能力受限^[42–44]; 与之相反, cAMP 信号通路的 2 个功能元件 (*VdPKAC1* 和 *VGB*) 则负调控微菌核的形成能力^[40–41]。转录因子作为重要的信号传导元件同样与大丽轮枝菌微菌核的发育密切相关, 已经报道的大多数转录因子 (如真菌特有转录因子 *Vdcpf*、钙调控转录因子 *VdCrz1* 等) 缺失均抑制了大丽轮枝菌微菌核的形成能力^[50, 56]; 而少数转录因子 (如 *VdSge1*、*VdMsn2* 和 *Vta2*) 缺失后则会诱导产生更多微菌核^[30, 53, 57]; Velvet 家族调控蛋白成员 (*VdVel1*、*VdVel2*、*VdVel3* 和 *VdVos1*) 则通过协同作用影响了微菌核的形成^[61]。此外, 也有报道某些分泌蛋白和微菌核形成相关, 如疏水蛋白 *VDH1* 缺失后丧失了形成微菌核的能力, 其可能通过影响菌丝黏附过程来调控微菌核形成^[85]; 类过敏原蛋白 *VdASP F2*^[84] 和 α -1,6-甘露糖基转移酶 *VdOCH*^[83] 同样也是微菌核形成所必需的, 但这些基因如何影响微菌核形成的机制尚不清楚。上述调控微菌核形成的基因多数与感应和传导信号有关, 决定了大丽轮枝菌侵染的状态, 因此多数与大丽轮枝菌致病性直接相关, 缺失后通常丧失了对寄主的致病能力, 如 *VdSge1*、*VdSsk2*、*Vta2* 等^[30–31, 53]。

另一方面, 黑色素在细胞间隙的积累和填充对微菌核形成也发挥了重要作用, 故一般认为微菌

核的形成和黑色素的积累紧密相关^[140-141]。大丽轮枝菌黑色素合成途径已被系统研究和报道, 科研工作者基于转录组和基因组分析首先明确了大丽轮枝菌中催化黑色素合成的基因簇, 该基因簇跨越基因组 48.8 kb 区域, 包含多个黑色素合成相关催化酶基因^[140]; 通过构建该途径关键基因突变体分析发现其中 5 个关键酶 (VdPKS1、VdT4HR、VdSCD、VdT3HR 和 VdLAC^[142]) 及转录因子 VdCmr1^[48] 均参与了黑色素合成过程; 缩链催化酶 VdVayg1 也被报道参与了大丽轮枝菌黑色素的合成^[94]。有意思的是, 这些突变体中仅有 VdVayg1 和 VdT3HR 参与了微菌核的形成, 其他基因缺失后虽然黑色素合成缺陷, 但微菌核的形成能力不受影响, 表明黑色素积累与微菌核形成并不直接相关, 二者可能存在交叉调控信号通路^[142]。此外, 针对膜受体或者转录因子的研究证据表明微菌核形成与黑色素积累并没有直接关系, 如跨膜受体 VdSho1 缺失后黑色素合成能力受限、但并不影响微菌核的形成能力^[39]; 类似黑色素合成关键基因 VdPKS1 缺失突变体^[93], 转录因子 Vta1 缺失后仍能够形成没有黑色素沉积的微菌核^[54]。因此, 推测大丽轮枝菌微菌核形成可能从菌丝细胞膨大到“微菌核前体”, 再通过黑色素沉积形成成熟微菌核的两个相对独立过程。这也是黑色素合成相关基因不同于调控微菌核形成基因, 缺失后并不影响大丽轮枝菌对寄主的致病力的重要原因^[48]。

7 其他功能相关基因

除了上述描述的功能基因外, 仍有大量参与或调控不同生物过程的功能基因通过影响大丽轮枝菌的其他生物学性状, 最终影响了其对寄主的侵染能力 (表 1)。如染色质重塑相关基因 VdDpb4 和 VdIsw2 通过影响基因组 DNA 修复来应答寄主植物 ROS 胁迫^[114]。组蛋白 E3 连接酶 VdBre1 通过调控大丽轮枝菌脂质代谢, 进而影响次生代谢物的合成发挥致病功能^[97]; Velvet 家族调控蛋白成员^[61]及细胞色素氧化酶 VdCYP1^[95] 也同样调控了病原的次级代谢通路, 表现出与致病性相关的特性。部分基础代谢基因如磷酸盐代谢通路的关键基因 VdNUC-2^[108]和参与维生素 B1 运输的 VdThit 基因^[110]

也与致病性有关, 缺失后病原对寄主的致病力显著下降。参与细胞器形成的基因 (如细胞自噬体相关基因 VdATG8/12^[100]) 也被报道和病原的致病性有关。

8 总结与展望

上述针对大丽轮枝菌功能基因的鉴定和作用机制研究, 为理解其重要生物学性状的形成及其与致病性的关系提供重要支撑。大丽轮枝菌的致病性在很大程度上是由于其决定生物学性状的功能基因来决定的, 厘清这一关系将为准确理解大丽轮枝菌致病相关基因概念及致病性形成的分子基础提供重要理论依据。

目前的研究成果大部分只是对单个基因的研究, 未能系统揭示大丽轮枝菌重要生物学性状的功能基因网络。随着研究的进一步深入, 特别受益于基因组学研究蓬勃发展时代的来临, 越来越多与大丽轮枝菌重要生物性状相关的功能基因及其与病原的致病性关系将被陆续阐明, 最终形成与重要生物学性状和致病性关联的功能基因网络。目前, 美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 已经公布了来源不同寄主的 36 个大丽轮枝菌基因组 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!eukaryotes/832/>), 近期国内发起的黄萎病菌基因组研究计划 (Verticilli-Omics) 释放了来源 10 个国家的 26 个寄主共 159 株大丽轮枝菌基因组^[4]。可以预见通过这些基因组数据的挖掘与比较分析工作, 将极大推动大丽轮枝菌主要生物学性状的功能基因鉴定与研究。后续针对大丽轮枝菌功能基因和重要生物学性状及致病性关系的研究重点包括: 一是需要明确致病性相关的功能基因, 其决定了什么重要生物学性状, 如定殖维管束、仅侵染双子叶植物等; 二是真正“毒素”致萎组分还有哪些, 这对丰富和完善“毒素”学说具有重要意义; 三是亟需明确决定大丽轮枝菌种群分化 (特别是无性系) 的功能基因, 以及这些基因与寄主适应性或者致病性的关系; 四是系统建立决定大丽轮枝菌重要生物学性状的功能基因网络, 并明确这些功能基因与致病性的关系。这些后续研究将最终为从功能基因决定生物性状角度阐明大丽轮枝菌致病形成的分子基础提供重要理论支撑, 并为有针对性地开发新型农药或利用 RNAi “跨界打靶”技

术防控黄萎病提供理论指导。

参考文献

- [1] Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, et al. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species [J] . Annu Rev Phytopathol, 2009, 47 (1) : 39-62.
- [2] Pegg GF, Brady BL. *Verticillium* wilts [M] . Wallingford : CABI, 2002.
- [3] Wilhelm S. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field [J] . Phytopathology, 1955, 45 (3) : 180-181.
- [4] Chen JY, Klosterman SJ, Hu XP, et al. Key insights and research prospects at the dawn of the population genomics era for *Verticillium dahliae* [J] . Annu Rev Phytopathol, 2021, 59 : 31-51.
- [5] Fradin EF, Thomma BPHJ. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* [J] . Mol Plant Pathol, 2006, 7 (2) : 71-86.
- [6] Chen JY, Xiao HL, Gui YJ, et al. Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium [J] . Front Microbiol, 2016, 7 : 1709.
- [7] Dobinson KF, Grant SJ, Kang S. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J] . Curr Genet, 2004, 45 (2) : 104-110.
- [8] Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, et al. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens [J] . PLoS Pathog, 2011, 7 (7) : e1002137.
- [9] de Jonge R, Bolton MD, Kombrink A, et al. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen [J] . Genome Res, 2013, 23 (8) : 1271-1282.
- [10] Chen JY, Liu C, Gui YJ, et al. Comparative genomics reveals cotton-specific virulence factors in flexible genomic regions in *Verticillium dahliae* and evidence of horizontal gene transfer from *Fusarium* [J] . New Phytol, 2018, 217 (2) : 756-770.
- [11] Klimes A, Dobinson KF, Thomma BP, et al. Genomics spurs rapid advances in our understanding of the biology of vascular wilt pathogens in the genus *Verticillium* [J] . Annu Rev Phytopathol, 2015, 53 : 181-198.
- [12] Buchner V, Nachmias A, Burstein Y. Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein-lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae* [J] . FEBS Lett, 1982, 138 (2) : 261-264.
- [13] Meyer R, Dubery IA. High-affinity binding of a protein-lipopolysaccharide phytotoxin from *Verticillium dahliae* to cotton membranes [J] . FEBS Lett, 1993, 335 (2) : 203-206.
- [14] Davis DA, Low PS, Heinsteins P. Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae* [J] . Physiol Mol Plant Pathol, 1998, 52 (4) : 259-273.
- [15] 章元寿, 王建新, 刘经芬, 等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定 [J] . 真菌学报, 1989, 8 (2) : 140-147.
- Zhang YS, Wang JX, Liu JF, et al. Studies on the isolation, purification and bioassay of toxin from *Verticillium dahliae* kleb [J] . Mycosystema, 1989, 8 (2) : 140-147.
- [16] 储昭庆, 贾军伟, 周向军, 等. 大丽轮枝菌分泌糖蛋白的分离及其致萎性研究 [J] . 植物学报, 1999, 41 (9) : 972-976.
- Chu ZQ, Jia JW, Zhou XJ, et al. Isolation of glycoproteins from *Verticillium dahliae* and their phytotoxicity [J] . Acta Bot Sin, 1999, 41 (9) : 972-976.
- [17] Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* : going back and forth [J] . Trends Genet, 1997, 13 (4) : 152-156.
- [18] de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J] . Nat Biotechnol, 1998, 16 (9) : 839-842.
- [19] 徐荣旗, 汪佳妮, 陈捷胤, 等. 棉花黄萎病菌 T-DNA 插入突变体表型特征和侧翼序列分析 [J] . 中国农业科学, 2010, 43 (3) : 489-496.
- Xu RQ, Wang JN, Chen JY, et al. Analysis of T-DNA insertional flanking sequence and mutant phenotypic characteristics in *Verticillium dahliae* [J] . Sci Agric Sin, 2010, 43 (3) : 489-496.
- [20] 张键. 向日葵大丽轮枝菌 T-DNA 突变体库的构建及微菌核形成和致病力相关基因的研究 [D] . 呼和浩特 : 内蒙古农业大学, 2016.
- Zhang J. The T-DNA mutant library construction and the function study on genes involved in the microsclerotia formation and pathogenicity [D] . Hohhot : Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [21] Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, et al. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis [J] . Mol Biotechnol, 2011, 49 (3) : 209-221.

- [22] Gao F, Zhou BJ, Li GY, et al. A glutamic acid-rich protein identified in *Verticillium dahliae* from an insertional mutagenesis affects microsclerotial formation and pathogenicity [J] . *PLoS One*, 2010, 5 (12) : e15319.
- [23] Zhang YL, Li ZF, Feng ZL, et al. Functional analysis of the pathogenicity-related gene VdPR1 in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J] . *PLoS One*, 2016, 11 (11) : e0166000. DOI : 10.1371/journal.pone.0166000.
- [24] Zhang YL, Li ZF, Feng ZL, et al. Isolation and functional analysis of the pathogenicity-related gene VdPR3 from *Verticillium dahliae* on cotton [J] . *Curr Genet*, 2015, 61 (4) : 555-566.
- [25] Zhang WQ, Gui YJ, Short DPG, et al. *Verticillium dahliae* transcription factor VdFTF1 regulates the expression of multiple secreted virulence factors and is required for full virulence in cotton [J] . *Mol Plant Pathol*, 2018, 19 (4) : 841-857.
- [26] Zhang DD, Wang J, Wang D, et al. Population genomics demystifies the defoliation phenotype in the plant pathogen *Verticillium dahliae* [J] . *New Phytol*, 2019, 222 (2) : 1012-1029.
- [27] Sarmiento-Villamil JL, García-Pedrajas NE, Cañizares MC, et al. Molecular mechanisms controlling the disease cycle in the vascular pathogen *Verticillium dahliae* characterized through forward genetics and transcriptomics [J] . *Mol Plant Microbe Interact*, 2020, 33 (6) : 825-841.
- [28] de Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, et al. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing [J] . *PNAS*, 2012, 109 (13) : 5110-5115.
- [29] Chavarro-Carrero EA, Vermeulen JP, E Torres D, et al. Comparative genomics reveals the in planta-secreted *Verticillium dahliae* Av2 effector protein recognized in tomato plants that carry the V2 resistance locus [J] . *Environ Microbiol*, 2021, 23 (4) : 1941-1958.
- [30] Santhanam P, Thomma BP. *Verticillium dahliae* Sge1 differentially regulates expression of candidate effector genes [J] . *Mol Plant Microbe Interact*, 2013, 26 (2) : 249-256.
- [31] Yu J, Li T, Tian LY, et al. Two *Verticillium dahliae* MAPKKs, VdSsk2 and VdSte11, have distinct roles in pathogenicity, microsclerotial formation, and stress adaptation [J] . *mSphere*, 2019, 4 (4) : e00426-19. DOI : 10.1128/msphere.00426-19.
- [32] Hu D, Wang C, Tao F, et al. Whole genome wide expression profiles on germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia [J] . *PLoS One*, 2014, 9 (6) : e100046.
- [33] Hu X, Puri KD, Gurung S, et al. Proteome and metabolome analyses reveal differential responses in tomato -*Verticillium dahliae*-interactions [J] . *J Proteomics*, 2019, 207 : 103449.
- [34] Li J, Pei J, Liu Y, et al. Transcriptome sequencing of *Verticillium dahliae* from a cotton farm reveals positive correlation between virulence and tolerance of sugar-induced hyperosmosis [J] . *PeerJ*, 2019, 7 : e8035.
- [35] Sperschneider J, Gardiner DM, Dodds PN, et al. EffectorP : predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning [J] . *New Phytol*, 2016, 210 (2) : 743-761.
- [36] Sperschneider J, Dodds PN, Singh KB, et al. ApoplastP : prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning [J] . *New Phytol*, 2018, 217 (4) : 1764-1778.
- [37] Wang D, Tian L, Zhang DD, et al. Functional analyses of small secreted cysteine-rich proteins identified candidate effectors in *Verticillium dahliae* [J] . *Mol Plant Pathol*, 2020, 21 (5) : 667-685.
- [38] Tian L, Xu J, Zhou L, et al. VdMsb regulates virulence and microsclerotia production in the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae* [J] . *Gene*, 2014, 550 (2) : 238-244.
- [39] Li JJ, Zhou L, Yin CM, et al. The *Verticillium dahliae* Sho1-MAPK pathway regulates melanin biosynthesis and is required for cotton infection [J] . *Environ Microbiol*, 2019, 21 (12) : 4852-4874.
- [40] Tzima A, Paplomatas EJ, Rauiyaree P, et al. Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae* [J] . *Fungal Genet Biol*, 2010, 47 (5) : 406-415.
- [41] Tzima AK, Paplomatas EJ, Tsitsigiannis DI, et al. The G protein β subunit controls virulence and multiple growth- and development-related traits in *Verticillium dahliae* [J] . *Fungal Genet Biol*, 2012, 49 (4) : 271-283.
- [42] Tian LY, Wang YL, Yu J, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase VdPbs2 of *Verticillium dahliae* regulates microsclerotia formation, stress response, and plant infection [J] . *Front Microbiol*, 2016, 7 : 1532.
- [43] Wang Y, Tian L, Xiong D, et al. The mitogen-activated protein kinase gene, VdHog1, regulates osmotic stress response, microsclerotia formation and virulence in *Verticillium dahliae* [J] .

- Fungal Genet Biol, 2016, 88 : 13-23.
- [44] Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD, Kang S, et al. Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae* [J] . Curr Genet, 2005, 48 (2) : 109-116.
- [45] Tzima AK, Paplomatas EJ, Rauyaree P, et al. VdSNF1, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation [J] . Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24 (1) : 129-142.
- [46] Li L, Zhu T, Song Y, et al. Functional characterization of target of rapamycin signaling in *Verticillium dahliae* [J] . Front Microbiol, 2019, 10 : 501.
- [47] Sarmiento-Villamil JL, García-Pedrajas NE, Baeza-Montañez L, et al. The APSES transcription factor Vst1 is a key regulator of development in microsclerotium- and resting mycelium-producing *Verticillium* species [J] . Mol Plant Pathol, 2018, 19 (1) : 59-76.
- [48] Wang Y, Hu X, Fang Y, et al. Transcription factor VdCmr1 is required for pigment production, protection from UV irradiation, and regulates expression of melanin biosynthetic genes in *Verticillium dahliae* [J] . Microbiology: Reading, 2018, 164 (4) : 685-696.
- [49] Wang YL, Deng CL, Tian LY, et al. The transcription factor VdHapX controls iron homeostasis and is crucial for virulence in the vascular pathogen *Verticillium dahliae* [J] . mSphere, 2018, 3 (5) : e00400-18. DOI : 10.1128/msphere.00400-18.
- [50] Luo X, Mao H, Wei Y, et al. The fungal-specific transcription factor Vdpf influences conidia production, melanized microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae* [J] . Mol Plant Pathol, 2016, 17 (9) : 1364-1381.
- [51] Tang C, Jin X, Klosterman SJ, et al. Convergent and distinctive functions of transcription factors VdYap1, VdAtf1, and VdSkn7 in the regulation of nitrosative stress resistance, microsclerotia formation, and virulence in *Verticillium dahliae* [J] . Mol Plant Pathol, 2020, 21 (11) : 1451-1466.
- [52] Bui TT, Harting R, Braus-Stromeier SA, et al. *Verticillium dahliae* transcription factors Som1 and Vta3 control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonisation to induce disease [J] . New Phytol, 2019, 221 (4) : 2138-2159.
- [53] Tran VT, Braus-Stromeier SA, Kusch H, et al. *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots [J] . New Phytol, 2014, 202 (2) : 565-581.
- [54] Harting R, Höfer A, Tran VT, et al. The Vta1 transcriptional regulator is required for microsclerotia melanization in *Verticillium dahliae* [J] . Fungal Biol, 2020, 124 (5) : 490-500.
- [55] Xiong D, Wang Y, Tian L, et al. MADS-box transcription factor VdMcm1 regulates conidiation, microsclerotia formation, pathogenicity, and secondary metabolism of *Verticillium dahliae* [J] . Front Microbiol, 2016, 7 : 1192.
- [56] Xiong D, Wang Y, Tang C, et al. VdCrz1 is involved in microsclerotia formation and required for full virulence in *Verticillium dahliae* [J] . Fungal Genet Biol, 2015, 82 : 201-212.
- [57] Tian L, Yu J, Wang Y, et al. The C₂H₂ transcription factor VdMsn2 controls hyphal growth, microsclerotia formation, and virulence of *Verticillium dahliae* [J] . Fungal Biol, 2017, 121 (12) : 1001-1010.
- [58] Tang C, Li T, Klosterman SJ, et al. The bZIP transcription factor VdAtf1 regulates virulence by mediating nitrogen metabolism in *Verticillium dahliae* [J] . New Phytol, 2020, 226 (5) : 1461-1479.
- [59] Starke J, Harting R, Maurus I, et al. Unfolded protein response and scaffold independent pheromone MAP kinase signaling control *Verticillium dahliae* growth, development, and plant pathogenesis [J] . J Fungi (Basel), 2021, 7 (4) : 305.
- [60] Timpner C, Braus-Stromeier SA, Tran VT, et al. The Cpc1 regulator of the cross-pathway control of amino acid biosynthesis is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium longisporum* [J] . Mol Plant Microbe Interactions®, 2013, 26(11) : 1312-1324.
- [61] Höfer AM, Harting R, Aßmann NF, et al. The velvet protein Vel1 controls initial plant root colonization and conidia formation for xylem distribution in *Verticillium wilt* [J] . PLoS Genet, 2021, 17 (3) : e1009434.
- [62] Gui YJ, Chen JY, Zhang DD, et al. *Verticillium dahliae* manipulates plant immunity by glycoside hydrolase 12 proteins in conjunction with carbohydrate-binding module 1 [J] . Environ Microbiol, 2017, 19 (5) : 1914-1932.
- [63] Gui YJ, Zhang WQ, Zhang DD, et al. A *Verticillium dahliae*

- extracellular cutinase modulates plant immune responses [J] .
Mol Plant Microbe Interact, 2018, 31 (2) : 260-273.
- [64] Yang YK, Zhang Y, Li BB, et al. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence [J] . Front Plant Sci, 2018, 9 : 1271.
- [65] Cheng XX, Zhao LH, Klosterman SJ, et al. The endochitinase VDECH from *Verticillium dahliae* inhibits spore germination and activates plant defense responses [J] . Plant Sci, 2017, 259 : 12-23.
- [66] Yin Z, Wang N, Pi L, et al. *Nicotiana benthamiana* LRR-RLP NbEIX2 mediates the perception of an EIX-like protein from *Verticillium dahliae* [J] . J Integr Plant Biol, 2021, 63 (5) : 949-960.
- [67] Zhou BJ, Jia PS, Gao F, et al. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae* [J] . Mol Plant Microbe Interact, 2012, 25 (7) : 964-975.
- [68] Santhanam P, van Esse HP, Albert I, et al. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family [J] . Mol Plant Microbe Interact, 2013, 26 (3) : 278-286.
- [69] Liu T, Song T, Zhang X, et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis [J] . Nat Commun, 2014, 5 : 4686.
- [70] Kombrink A, Rovenich H, Shi-Kunne X, et al. *Verticillium dahliae* LysM effectors differentially contribute to virulence on plant hosts [J] . Mol Plant Pathol, 2017, 18 (4) : 596-608.
- [71] Zhang Y, Gao YH, Liang YB, et al. The *Verticillium dahliae* SnodProt1-like protein VdCPI contributes to virulence and triggers the plant immune system [J] . Front Plant Sci, 2017, 8 : 1880.
- [72] Wang B, Yang X, Zeng H, et al. The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco [J] . Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93 (1) : 191-201.
- [73] Qin J, Wang KL, Sun LF, et al. The plant-specific transcription factors CBP60g and SARD1 are targeted by a *Verticillium* secretory protein VdSCP41 to modulate immunity [J] . Elife, 2018, 7 : e34902.
- [74] Gao F, Zhang BS, Zhao JH, et al. Deacetylation of chitin oligomers increases virulence in soil-borne fungal pathogens [J] . Nat Plants, 2019, 5 (11) : 1167-1176.
- [75] Han LB, Li YB, Wang FX, et al. The cotton apoplastic protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahliae* [J] . Plant Cell, 2019, 31 (2) : 520-536.
- [76] Wang D, Chen JY, Song J, et al. Cytotoxic function of xylanase VdXyn4 in the plant vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae* [J] . Plant Physiol, 2021, 187 (1) : 409-429.
- [77] Liu L, Wang Z, Li J, et al. *Verticillium dahliae* secreted protein Vd424Y is required for full virulence, targets the nucleus of plant cells, and induces cell death [J] . Mol Plant Pathol, 2021, 22 (9) : 1109-1120.
- [78] Zhang L, Ni H, Du X, et al. The *Verticillium*-specific protein VdSCP7 localizes to the plant nucleus and modulates immunity to fungal infections [J] . New Phytol, 2017, 215 (1) : 368-381.
- [79] Ma AF, Zhang DP, Wang GX, et al. *Verticillium dahliae* effector VDAL protects MYB6 from degradation by interacting with PUB25 and PUB26 E3 ligases to enhance *Verticillium* wilt resistance [J] . Plant Cell, doi (10. 1093) : pcell.
- [80] Tian L, Li J, Huang C, et al. Cu/Zn superoxide dismutase (VdSO-D1) mediates reactive oxygen species detoxification and modulates virulence in *Verticillium dahliae* [J] . Mol Plant Pathol, 2021, 22 (9) : 1092-1108.
- [81] Tian L, Sun WX, Li JJ, et al. Unconventionally secreted manganese superoxide dismutase VdSOD3 is required for the virulence of *Verticillium dahliae* [J] . Agronomy, 2020, 11 (1) : 13.
- [82] Tian L, Huang CM, Zhang DD, et al. Extracellular superoxide dismutase VdSOD5 is required for virulence in *Verticillium dahliae* [J] . J Integr Agric, 2021, 20 (7) : 1858-1870.
- [83] Zhang J, Zhang YY, Yang JF, et al. The α -1, 6-mannosyltransferase VdOCH₁ plays a major role in microsclerotium formation and virulence in the soil-borne pathogen *Verticillium dahliae* [J] . Fungal Biol, 2019, 123 (7) : 539-546.
- [84] Xie CJ, Li QL, Yang XY. Characterization of VdASP F₂ secretory factor from *Verticillium dahliae* by a fast and easy gene knockout system [J] . Mol Plant Microbe Interact, 2017, 30 (6) : 444-454.
- [85] Klimes A, Dobinson KF. A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae* [J] . Fungal Genet Biol, 2006, 43(4) :

- 283-294.
- [86] Liu SY, Chen JY, Wang JL, et al. Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae* [J]. Gene, 2013, 529 (2) : 307-316.
- [87] Sun L, Qin J, Rong W, et al. Cellophane surface-induced gene, *VdCSIN1*, regulates hyphopodium formation and pathogenesis via cAMP-mediated signalling in *Verticillium dahliae* [J]. Mol Plant Pathol, 2019, 20 (3) : 323-333.
- [88] Zhao YL, Zhou TT, Guo HS. Hyphopodium-specific VdNoxB/*VdPls1*-dependent ROS-Ca²⁺ signaling is required for plant infection by *Verticillium dahliae* [J]. PLoS Pathog, 2016, 12 (7) : e1005793.
- [89] 孙琦, 何芳, 邵胜楠, 等. 棉花黄萎病菌 VdHP1 的克隆及功能分析 [J]. 中国农业科学, 2020, 53 (14) : 2872-2884.
- Sun Q, He F, Shao SN, et al. Cloning and functional analysis of VdHP1 in *Verticillium dahliae* from cotton [J]. Sci Agric Sin, 2020, 53 (14) : 2872-2884.
- [90] Zhou TT, Zhao YL, Guo HS. Secretory proteins are delivered to the septin-organized penetration interface during root infection by *Verticillium dahliae* [J]. PLoS Pathog, 2017, 13 (3) : e1006275.
- [91] Wang J, Tian L, Zhang DD, et al. SNARE-encoding genes VdSec22 and VdSso1 mediate protein secretion required for full virulence in *Verticillium dahliae* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2018, 31 (6) : 651-664.
- [92] Feng ZD, Tian J, Han LB, et al. The Myosin5-mediated actomyosin motility system is required for *Verticillium* pathogenesis of cotton [J]. Environ Microbiol, 2018, 20 (4) : 1607-1621.
- [93] Zhang T, Zhang BS, Hua CL, et al. VdPKS1 is required for melanin formation and virulence in a cotton wilt pathogen *Verticillium dahliae* [J]. Sci China Life Sci, 2017, 60 (8) : 868-879.
- [94] Fan R, Klosterman SJ, Wang CH, et al. Vayg1 is required for microsclerotium formation and melanin production in *Verticillium dahliae* [J]. Fungal Genet Biol, 2017, 98 : 1-11.
- [95] Zhang DD, Wang XY, Chen JY, et al. Identification and characterization of a pathogenicity-related gene VdCYP1 from *Verticillium dahliae* [J]. Sci Rep, 2016, 6 : 27979.
- [96] Luo X, Tian T, Tan X, et al. VdNPS, a nonribosomal peptide synthetase, is involved in regulating virulence in *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 2020, 110 (8) : 1398-1409.
- [97] Wang H, Chen B, Tian J, et al. *Verticillium dahliae* VdBre1 is required for cotton infection by modulating lipid metabolism and secondary metabolites [J]. Environ Microbiol, 2021, 23 (4) : 1991-2003.
- [98] Yuan L, Su Y, Zhou S, et al. A RACK1-like protein regulates hyphal morphogenesis, root entry and *in vivo* virulence in *Verticillium dahliae* [J]. Fungal Genet Biol, 2017, 99 : 52-61.
- [99] Klimes A, Neumann MJ, Grant SJ, et al. Characterization of the glyoxalase I gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. Can J Microbiol, 2006, 52 (9) : 816-822.
- [100] Zhou L, Zhao J, Guo W, et al. Functional analysis of autophagy genes via *Agrobacterium*-mediated transformation in the vascular Wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. J Genet Genomics, 2013, 40 (8) : 421-431.
- [101] Vangalis V, Papaioannou IA, Markakis EA, et al. Hex1, the major component of woronin bodies, is required for normal development, pathogenicity, and stress response in the plant pathogenic fungus *Verticillium dahliae* [J]. J Fungi (Basel), 2020, 6 (4) : 344.
- [102] Su XF, Lu GQ, Li XK, et al. Host-induced gene silencing of an adenylate kinase gene involved in fungal energy metabolism improves plant resistance to *Verticillium dahliae* [J]. Biomolecules, 2020, 10 (1) : 127.
- [103] Santhanam P, Boshoven JC, Salas O, et al. Rhamnose synthase activity is required for pathogenicity of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* [J]. Mol Plant Pathol, 2017, 18 (3) : 347-362.
- [104] Tian H, Zhou L, Guo W, et al. Small GTPase Rac1 and its interaction partner Cla4 regulate polarized growth and pathogenicity in *Verticillium dahliae* [J]. Fungal Genet Biol, 2015, 74 : 21-31.
- [105] Kramer HM, Cook DE, van den Berg GCM, et al. Three putative DNA methyltransferases of *Verticillium dahliae* differentially contribute to DNA methylation that is dispensable for growth, development and virulence [J]. Epigenetics Chromatin, 2021, 14 (1) : 21.
- [106] Su XF, Rehman L, Guo HM, et al. The oligosaccharyl transferase subunit *STT3* mediates fungal development and is required for virulence in *Verticillium dahliae* [J]. Curr Genet, 2018, 64 (1) : 235-246.

- [107] Li ZF, Liu YJ, Feng ZL, et al. VdCYC8, encoding CYC8 glucose repression mediator protein, is required for microsclerotia formation and full virulence in *Verticillium dahliae* [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12) : e0144020.
- [108] Deng S, Wang CY, Zhang X, et al. VdNUG-2, the key regulator of phosphate responsive signaling pathway, is required for *Verticillium dahliae* infection [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12) : e0145190.
- [109] Qi XL, Li XK, Guo HM, et al. VdPLP, A patatin-like phospholipase in *Verticillium dahliae*, is involved in cell wall integrity and required for pathogenicity [J]. *Genes*, 2018, 9 (3) : 162.
- [110] Qi X, Su X, Guo H, et al. VdThit, a thiamine transport protein, is required for pathogenicity of the vascular pathogen *Verticillium dahliae* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2016, 29 (7) : 545-559.
- [111] Short DP, Gurung S, Hu XP, et al. Maintenance of sex-related genes and the co-occurrence of both mating types in *Verticillium dahliae* [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (11) : e112145.
- [112] Vangalis V, Papaioannou IA, Markakis EA, et al. The NADPH oxidase A of *Verticillium dahliae* is essential for pathogenicity, normal development, and stress tolerance, and it interacts with Yap1 to regulate redox homeostasis [J]. *J. Fungi*, 2021, 7 (9) : 740.
- [113] Zhang J, Cui W, Abdul Haseeb H, et al. VdNop12, containing two tandem RNA recognition motif domains, is a crucial factor for pathogenicity and cold adaption in *Verticillium dahliae* [J]. *Environ Microbiol*, 2020, 22 (12) : 5387-5401.
- [114] Wang S, Wu XM, Liu CH, et al. *Verticillium dahliae* chromatin remodeling facilitates the DNA damage repair in response to plant ROS stress [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16 (4) : e1008481. DOI : 10.1371/journal.ppat.1008481.
- [115] Li X, Su X, Lu G, et al. VdOGDH is involved in energy metabolism and required for virulence of *Verticillium dahliae* [J]. *Curr Genet*, 2020, 66 (2) : 345-359.
- [116] Qin TF, Hao W, Sun RR, et al. *Verticillium dahliae* VdTHI20, involved in pyrimidine biosynthesis, is required for DNA repair functions and pathogenicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (4) : 1378.
- [117] Zhu X, Soliman A, Islam MR, et al. *Verticillium dahliae*'s isochorismatase hydrolase is a virulence factor that contributes to interference with potato's salicylate and jasmonate defense signaling [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8 : 399.
- [118] Zhang Y, Wang XF, Rong W, et al. Histochemical analyses reveal that stronger intrinsic defenses in *Gossypium barbadense* than in *G. hirsutum* are associated with resistance to *Verticillium dahliae* [J]. *Mol Plant Microbe Interactions®*, 2017, 30 (12) : 984-996.
- [119] Street PFS, Cooper RM. Quantitative measurement of vascular flow in petioles of healthy and *Verticillium*-infected tomato [J]. *Plant Pathol*, 1984, 33 (4) : 483-492.
- [120] Pegg GF. Phytotoxin Production by *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold [J]. *Nature*, 1965, 208 (5016) : 1228-1229.
- [121] Wang JY, Cai Y, Gou JY, et al. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 (8) : 4989-4995.
- [122] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444 (7117) : 323-329.
- [123] Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20 (1) : 10-16.
- [124] Zhang Y, Gao Y, Liang Y, et al. *Verticillium dahliae* PevD1, an Alt a 1-like protein, targets cotton PR5-like protein and promotes fungal infection [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70 (2) : 613-626.
- [125] Liang Y, Li Z, Zhang Y, et al. Nbnrp1 mediates *Verticillium dahliae* effector PevD1-triggered defense responses by regulating sesquiterpenoid phytoalexins biosynthesis pathway in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Gene*, 2021, 768 : 145280.
- [126] Zhang Y, Gao YH, Wang HL, et al. *Verticillium dahliae* secretory effector PevD1 induces leaf senescence by promoting ORE1-mediated ethylene biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2021, 14 (11) : 1901-1917.
- [127] Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, et al. Fungal effectors and plant susceptibility [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66 : 513-545.
- [128] de Sain M, Rep M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (10) : 23970-23993.
- [129] 王宝丽. 大丽轮枝菌纤维素结合域蛋白 VdCBM1 调控寄主免疫反应的致病机理研究 [D]. 北京 : 中国农业科学院, 2019.

- Wang BL. Host immune response regulated by cellulose binding domain protein VdCBM1 of *Verticillium dahliae* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [130] Fradin EF, Zhang Z, Juarez Ayala JC, et al. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1 [J]. Plant Physiol, 2009, 150 (1): 320-332.
- [131] Usami T, Momma N, Kikuchi S, et al. Race 2 of *Verticillium dahliae* infecting tomato in Japan can be split into two races with differential pathogenicity on resistant rootstocks [J]. Plant Pathol, 2017, 66 (2): 230-238.
- [132] Bhat RG, Subbarao KV. Host range specificity in *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1999, 89 (12): 1218-1225.
- [133] Usami T, Itoh M, Amemiya Y. Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic [J]. J Gen Plant Pathol, 2009, 75 (6): 422-427.
- [134] Usami T, Itoh M, Amemiya Y. Mating type gene MAT1-2-1 is common among Japanese isolates of *Verticillium dahliae* [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2008, 73 (6): 133-137.
- [135] Milgroom MG, Jiménez-Gasco MDM, Olivares García C, et al. Recombination between clonal lineages of the asexual fungus *Verticillium dahliae* detected by genotyping by sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e106740.
- [136] Short DP, Gurung S, Koike ST, et al. Frequency of *Verticillium* species in commercial spinach fields and transmission of *V. dahliae* from spinach to subsequent lettuce crops [J]. Phytopathology, 2015, 105 (1): 80-90.
- [137] Joaquim TR. Vegetative compatibility and virulence of strains of *Verticillium dahliae* from soil and potato plants [J]. Phytopathology, 1991, 81 (5): 552.
- [138] Strausbaugh CA, Schroth MN, Weinhold AR, et al. Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* Tester strains and isolates from California potatoes [J]. Phytopathology, 1992, 82 (1): 61.
- [139] Dhar N, Chen JY, Subbarao KV, et al. Hormone signaling and its interplay with development and defense responses in *Verticillium*-plant interactions [J]. Front Plant Sci, 2020, 11 : 584997.
- [140] Duressa D, Anchieta A, Chen D, et al. RNA-seq analyses of gene expression in the microsclerotia of *Verticillium dahliae* [J]. BMC Genomics, 2013, 14 : 607.
- [141] Xiong D, Wang Y, Ma J, et al. Deep mRNA sequencing reveals stage-specific transcriptome alterations during microsclerotia development in the smoke tree vascular wilt pathogen, *Verticillium dahliae* [J]. BMC Genomics, 2014, 15 : 324.
- [142] 樊荣, 徐小鸿, 曹亚松, 等. 大丽轮枝菌黑色素合成相关基因与微菌核形成的关系 [J]. 菌物学报, 2017, 36 (12): 1608-1615.
- Fan R, Xu XH, Cao YS, et al. The role of DHN melanin biosynthesis genes in microsclerotium formation in *Verticillium dahliae* [J]. Mycosystema, 2017, 36 (12): 1608-1615.

(责任编辑 朱琳峰)