

大丽轮枝菌 *VDmef2* 基因抗逆及致病相关性分析*

谢成建, 杨星勇

(重庆师范大学 生命科学院 重庆市特色作物资源工程技术研究中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】分析转录因子 *VDmef2* 在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中的功能。【方法】通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的基因重组法获得了 *VDmef2* 基因的定点敲除突变体,然后分析了该突变体在不同碳源及逆境条件下的表型以及大丽轮枝菌在 MIM 培养基上微菌核的形成情况,还分析了大丽轮枝菌对陆地棉(*Gossypium hirsutum*)的致病力。【结果】大丽轮枝菌转录因子 *VDmef2* 定位于细胞核。*VDmef2* 基因突变后,大丽轮枝菌微菌核形成能力降低,同时对 H_2O_2 更加敏感,也丧失了对陆地棉的致病力。【结论】转录因子 *VDmef2* 与大丽轮枝菌微菌核形成、耐氧化及致病力有关。

关键词: *VDmef2* 基因;MADS 转录因子;大丽轮枝菌;氧化压力;微菌核;致病力

中图分类号: Q939.95

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2018)04-0109-08

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)是一种土传维管束真菌病害,严重影响农业生产。该菌能够以微菌核的形式在土壤中长期存活,导致它引起的病害极难防治^[1]。研究者一直试图从植物中寻找抗性基因,如在番茄(*Solanum lycopersicum*)中找到的 *Ve1* 基因,该基因编码的抗性蛋白能特异性识别大丽轮枝菌生理小种 *race1* 的效应因子 *Ave1*,从而诱导番茄产生对 *race1* 的抗性^[2-4];在薄荷(*Mentha longifolia*)与海岛棉(*Gossypium barbadense*)找到的 *Ve1* 同源基因 *mVe1* 与 *Gbve1* 都提高了植物对大丽轮枝菌具有抗性^[5-6]。但研究发现在大丽轮枝菌基因组中存在大量转座子以及频繁的基因重组现象(Transposable elements)^[7-8];一些与致病相关的效应因子如 *Ave1* 正是聚集在这些高频基因重组区域(Highly dynamic lineage-specific genomic regions)^[9]。也正是因为转座子与基因重组导致大丽轮枝菌产生大量的生理小种,对宿主植物的防御快速产生抗性,使相关病害的防治工作更加困难。因此,有关大丽轮枝菌致病机理的研究对农业生产而言非常重要。目前,一些与大丽轮枝菌生长及致病相关的基因被识别,如大丽轮枝菌的 *NLP*^[10-12], *VdGARPI*^[13], *VDH1*^[14-15], *VdThi4*^[16], *Vta2*^[17], *EG-1*^[18], *CPCI*^[19], *VdSSP1*^[20], *VdSNF1*^[21] 等基因都与该菌的致病性相关。这些致病基因的表达被精密地调控,而转录因子在其中发挥了关键作用,如转录调节子 *Sge1* 就参与调控致病相关效应因子的表达^[22]。

MADS MEF2 类转录因子,具有 MADS-box 与 MEF2 等保守功能域^[23]。对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的研究结果表明,MADS MEF2 类转录因子 *ScRlm1* 对酿酒酵母的细胞壁完整性(Cell wall integrity)非常重要^[23]。*ScRlm1* 基因表达受细胞壁压力试剂(Agents that cause cell wall stress)如 Calcofluor White (CFW),Caffeine 等诱导;该基因突变后,酿酒酵母对温度变得更加敏感^[24]。此外,*ScRlm1* 基因在表达时具备 1 个保守 DNA 结合位点即 $TA(T/A)_4TAG$ ^[25-26]。基于上述研究,笔者通过同源比对(blastp)找到了大丽轮枝菌的 MADS 类转录因子 *VDmef2*。为了分析大丽轮枝菌 *VDmef2* 基因的功能,笔者进一步通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的基因重组法获得了 *VDmef2* 基因的定点敲除突变体,并分析了该突变体的表型以及它对陆地棉(*Gossypium hirsutum*)的致病力,为大丽轮枝菌致病机理的研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

使用农杆菌 AGL1 转化大丽轮枝菌 Vd991;质粒 pGFP, pG418 与 pSURG 分别用于基因敲除、互补及定位

* 收稿日期:2017-11-03 修回日期:2018-06-27 网络出版时间:2018-07-26 16:50

资助项目:国家自然科学基金青年项目(No. 31701734);重庆市自然科学基金((No. cstc2017jcyjA0573);重庆市教育委员会科学技术研究计划项目(No. KJ1500324)

第一作者简介:谢成建,男,副教授,博士,研究方向为黄萎病致病机理,E-mail:xcj614@163.com;通信作者:杨星勇,男,教授,博士,E-mail:yangxy94@swu.edu.cn

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180726.1650.036.html

载体^[29]。相关菌株与材料由笔者所在实验室保存。用于致病力分析的陆地棉种子由西南大学张正圣提供。将陆地棉种植在室温为 25 ℃ 的植物培养室内,每日光照时间为 16 h,光照强度为 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2 生物信息学分析

基于酵母 *ScRlm1* 基因编码的氨基酸序列在大丽轮枝菌基因组数据库(<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/verticillium-comparative-genomics-pro>)中进行同源比对,获得大丽轮枝菌同源基因 *VDmef2*(数据库登录号:VDAG_00939);采用 Clustal X 2.0 软件对 *VDmef2* 蛋白与其他真菌 *Rlm1* 类蛋白进行同源比对^[27]。

1.3 载体构建

依据基因组序列设计引物 5F/5R 和 3F/3R 分别扩增 *VDmef2* 基因上下游的目的片段。使用 Hyg-F/R 引物从 pSilent1 载体扩增潮霉素筛选标记基因,最后通过基因重组的方法把 3 段序列连接到 pGFP 做为基因敲除载体 pGFP-*VDmef2*^[28];扩增 *VDmef2* 基因以及上下游 1 500 bp 和 1 000 bp 序列连接到 pG418 做为基因互补载体 pG418-*VDmef2*;扩增无终止密码子的 *VDmef2* 基因表达序列连接到 pSURG 载体做为亚细胞定位载体 pSURG-*VDmef2*。用电转法将构建好的上述载体转入到农杆菌 AGL1 中。载体构建工作在笔者所在实验室完成。本研究所用引物具体信息参见表 1。

表 1 本研究用到的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
5F	<u>AGAAGAGTAATCTAGGGGAATGGGGGTGTCGTGAT</u>	<i>VDmef2</i> 基因上游片段扩增
5R	<u>GAGGGTTAATTGCGCTCGTGTGCGATAACGCGACGA</u>	<i>VDmef2</i> 基因上游片段扩增
3F	<u>TCCAGTGATCTTCGAGCAGGAATCTAGAGACAAG</u>	<i>VDmef2</i> 基因下游片段扩增
3R	<u>ATTACGAATTGGATCAGATCATCATGCCGTGTTGT</u>	<i>VDmef2</i> 基因下游片段扩增
Hyg -F	GCGCAATTAACCTCACTAAA	筛选标记基因扩增
Hyg -R	CGAAGATCACTGGGAACAAC	筛选标记基因扩增
5-out-F	ACACGGTGGCGCATCTCAAT	同源重组验证引物
3-out-R	TCGTTGAGGGTTGCCCAAG	同源重组验证引物
5-comp-F	<u>GGACTAGTGGGAATGGGGGTGTCGTGAT</u>	互补载体引物
3-comp-R	AGGCAAAGCCCGAGGTTTGA	互补载体引物
β -tublin-F	CCGTAACGGTGCCTACCTGA	RT-PCR 基因表达内参基因
β -tublin-R	AGCCTCCTCCTCGTACTCCT	RT-PCR 基因表达内参基因
939-F	CGCAACCGCTCTGTACCTT	<i>VDmef2</i> 基因表达分析
939-R	TCTGGGGCTCCATGGACTCG	<i>VDmef2</i> 基因表达分析
939-ex-F	CCCTTAATTAAATGGGTGCAAGGAAGATTGA	<i>VDmef2</i> 基因亚细胞定位分析
939-ex-R	<u>GGACTAGTGGACTCGACCTTGGGGCGTT</u>	<i>VDmef2</i> 基因亚细胞定位分析

注:下划线处为酶切位点或融合序列

1.4 大丽轮枝菌转化

按照笔者所在实验室建立的方法转化大丽轮枝菌^[28]。在摇床上以 28 ℃,160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件培养农杆菌 48 h,离心后用含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的 IM 诱导培养液重悬洗两次,最终稀释到 OD₆₆₀ 值约等于 0.15 为止。在摇床上以 28 ℃,160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件培养重悬的农杆菌约 7 h 使 OD₆₆₀ 值约为 0.45~0.5 时备用。转化前用 PDB 液体培养基培养约 7 天的大丽轮枝菌通过 3 层擦镜纸过滤获得分生孢子,用无菌水稀释,直到溶液中孢子密度为 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时备用。将制备好的农杆菌与大丽轮枝菌孢子按体积比为 1:1 混合后涂布在硝酸纤维素微孔滤膜上(孔径为 0.8 μm ,直径为 80 mm,上海半岛实业有限公司生产),滤膜平铺在含 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的固体 IM 平板上。在 25 ℃ 暗培养条件下培养 48 h 后,将膜转移到含 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的头孢霉素 PDA 培养基上,并根据载体的不同分别加入 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的潮霉素或 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的遗传霉素(G418)上,25 ℃ 倒置培养 5~7 d 长出菌落后用于进一步分析。

1.5 大丽轮枝菌表型分析

为了分析不同碳源、高盐、高渗透压和 H_2O_2 对大丽轮枝菌突变体(KO1和KO2,分别为两个独立筛选的 *VDmef2* 敲除突变体重复)、野生型(WT)和回复菌株(KO1-Compl)的生长以及产生微菌核能力的影响,取孢子密度为 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的上述4种大丽轮枝菌新鲜孢子溶液各 $3 \mu\text{L}$ 分别点播到含有 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl(高盐)、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山梨醇(高渗透压)以及不含任何上述物质(对照)的PDA培养基上;同样地,按上述方法将大丽轮枝菌也分别点播到含质量分数均为2%的葡萄糖、蔗糖和淀粉的调整察氏培养基(CDM)平板上以及MIM微菌核诱导培养基平板上^[28],置于 25°C 恒温培养箱中培养14天后,观察菌落形态(如有无或大小)以及微菌核的形成,并拍照。为了进一步分析不同浓度 H_2O_2 对 *VDmef2* 突变体生长的抑制效应,将梯度稀释后的大丽轮枝菌孢子溶液点播到含有不同浓度 H_2O_2 的CM培养基的平板上。

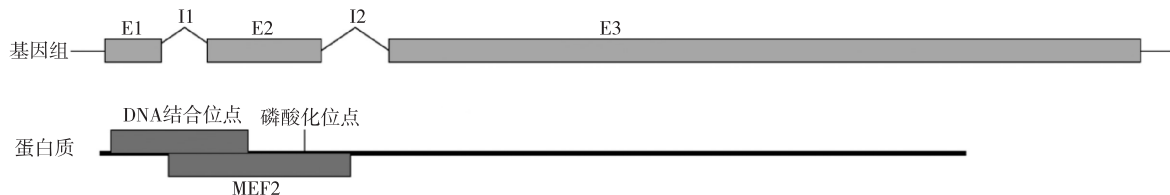
1.6 大丽轮枝菌致病力分析

用PDB培养基培养大丽轮枝菌7天后,用纱布过滤获得孢子,离心后无菌水重悬并将溶液中孢子密度调整为 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$;采用灌根法接种10 mL上述溶液到种植约42天的陆地棉幼苗的土壤中^[22]。侵染15天后观察植物的发病情况,并进行观察拍照。

2 结果

2.1 *Rlm1* 同源基因的识别与分析

通过比对,在大丽轮枝菌数据库找到了1个与 *ScRlm1* 基因高度同源的基因 *VDmef2*,该基因组序列包含两个内含子(图1)。*VDmef2* 蛋白由634个氨基酸组成,属于MADS MEF2类转录因子,具有MADS-box,MEF2和SAM保守功能域及DNA结合区(图1,图2)。同源比对分析还发现 *VDmef2* 蛋白氨基酸序列较为保守,与酿酒酵母 *ScRlm1*、黑曲霉(*Aspergillus niger*) *AnRlm1* 以及稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*) *MgMig1* 蛋白同源性较高。这主要是基于MADS-Box类转录因子是生物中一类较为保守的基因,在生物生长发育以及抗逆等功能中都扮演了重要角色。MADS-Box转录因子与基因组保守的CC(A/T)6GG序列相结合从而调控基因表达,它的保守功能域决定了这类转录因子的结合特异性。因此MADS-Box类转录因子虽然在物种中发挥不同的功能,但都具有MADS-Box保守功能域^[29]。



注: *VDmef2* 基因组序列包含3个外显子(E1, E2和E3)和两个内含子(I1和I2);蛋白结构分析表明 *VDmef2* 具备DNA结合区及磷酸化位点

图1 *VDmef2* 基因组结构和 *VDmef2* 蛋白结构

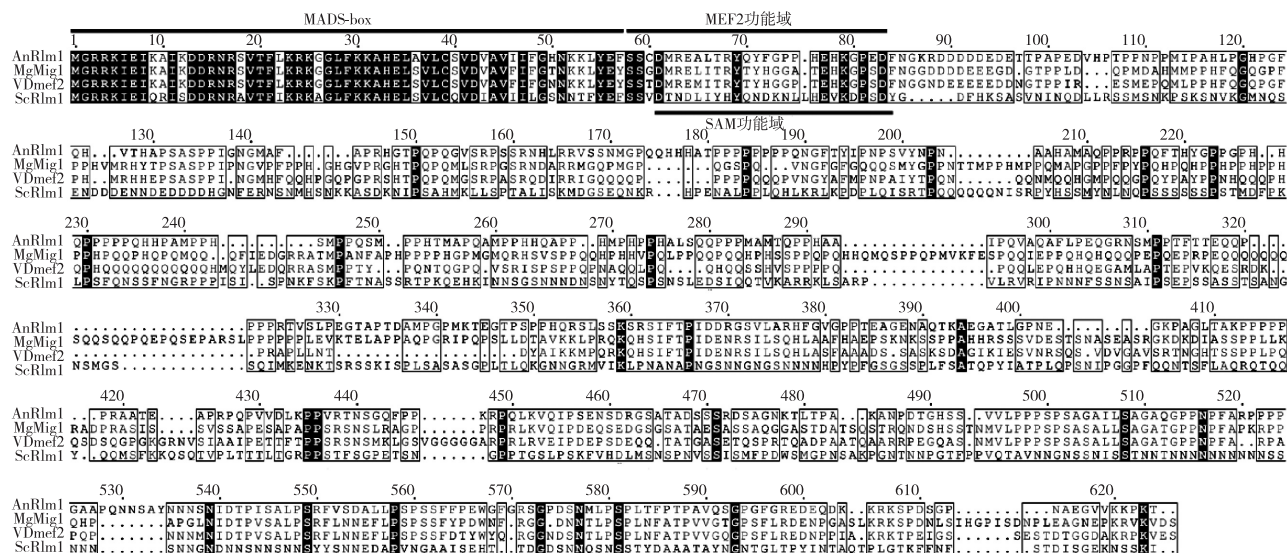
Fig. 1 Schema of the *VDmef2* gene structure and conserved N-terminal domain of *VDmef2* protein

2.2 *VDmef2* 蛋白定位分析

为了分析 *VDmef2* 蛋白在大丽轮枝菌中的亚细胞定位,笔者构建了 *VDmef2-eGFP* 融合表达基因,然后转化到大丽轮枝菌细胞内。转化子通过细胞核染料Hoechst染色后,然后笔者在荧光显微镜下观察到 *VDmef2-eGFP* 融合蛋白与Hoechst定位在同样的位置。这个结果表明 *VDmef2* 蛋白定位于大丽轮枝菌细胞核(图3)。

2.3 同源重组载体构建与鉴定

为了进一步分析 *VDmef2* 蛋白在大丽轮枝菌中的功能,通过本实验室建立的快速基因敲除载体构建和筛选体系^[29]敲除了大丽轮枝菌的 *VDmef2* 基因。对 *VDmef2* 基因上下游序列(5'端与3'端)以及潮霉素抗性表达框HygR进行扩增(图4a),然后在EXOIII的作用下融合进基因敲除载体pGFP,最终得到基因敲除载体pGFP-*VDmef2*。通过农杆菌介导转化大丽轮枝菌并基于荧光排除法初步筛选到基因敲除转化子候选菌株^[29],然后通过外延引物扩增基因组后的产物长度差异,基因敲除突变子(KO1与KO2)插入潮霉素表达框后扩增片段明显大于野生型大丽轮枝菌(WT)(图4b)及RT-PCR分析表面基因敲除突变子(KO1与KO2)未检测到 *VDmef2* 基因的表达,而基因回复菌KO1-Compl *VDmef2* 回复表达(图4c)。



注: Sc, An, Mg 和 VD 分别表示酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、黑曲霉 (*A. niger*)、稻瘟病菌 (*M. grisea*) 和大丽轮枝菌 (*V. dahliae*)

图 2 VDmef2 与其他真菌 Rlm1 类蛋白氨基酸序列同源比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of the VDmef2 with Rlm1-like proteins from other fungal species

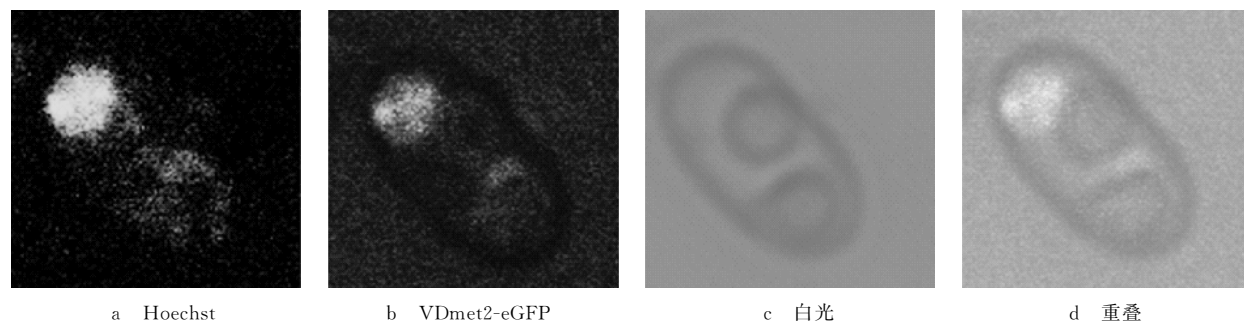
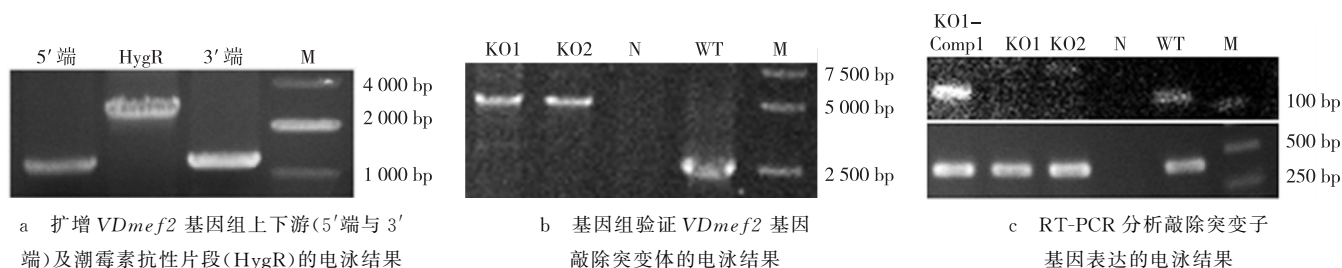


图 3 VDmef2 蛋白亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of VDmef2 protein



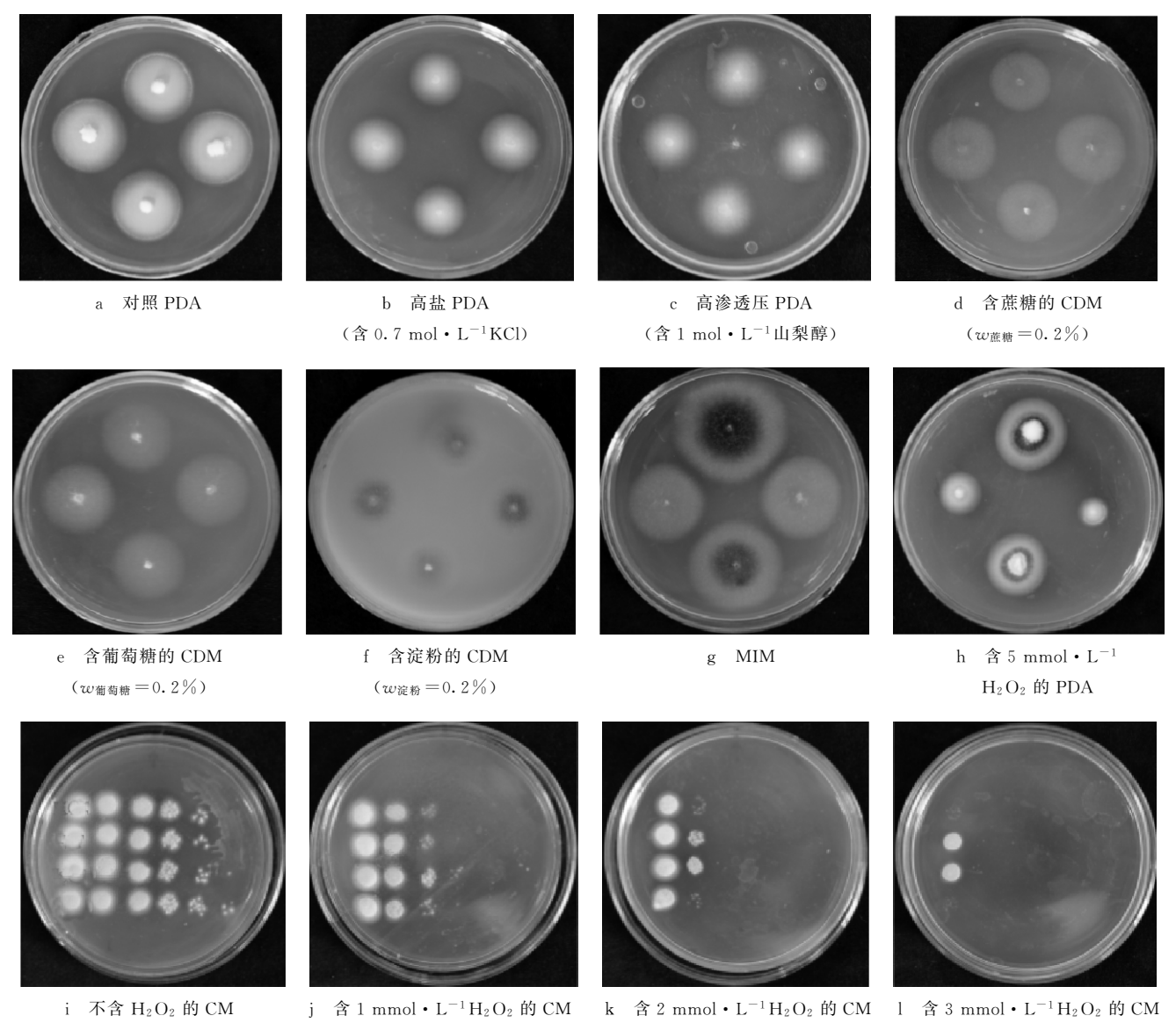
注: KO1 与 KO2 为两个 VDmef2 基因敲除突变菌株的两个重复, KO1-Compl 为 KO1 突变菌的基因回复转化子, WT 为大丽轮枝菌野生型, 下同; N 为双蒸水阴性对照, M 为 DNA 分子量标准

图 4 VDmef2 基因敲除突变体构建与筛选

Fig. 4 Construction and confirmation of VDmef2 gene deletion mutants

2.4 不同胁迫条件下大丽轮枝菌的表型分析

结果显示,两个 VDmef2 突变体 KO1 和 KO2 在对照(图 5a)、高盐(图 5b)和高渗透压(图 5c)的 PDA 培养基中没有表现出明显的生长差异,在含有不同碳源(蔗糖、葡萄糖与淀粉)的 CDM 培养基中也同样没有表现出明显的生长差异(图 5d,e,f)。然而, KO1 和 KO2 在 MIM 微菌核诱导培养基上产黑色微菌核的能力明显弱于 WT (图 5g)并对 H_2O_2 更加敏感(图 5h)。梯度稀释后的大丽轮枝菌孢子在不同浓度 H_2O_2 的 CM 培养基板上生长情况(图 5i,j,k,l)表明:在 H_2O_2 浓度为 2 和 3 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 CM 平板上, KO1 和 KO2 的生长明显慢于 WT 和 KO1-Compl(图 5k,l)。



注:a 到 h 为接种 14 天后拍摄,各图中显示的 4 个菌落分别为 WT(上)、KO1(左)、KO2(右)和 KO1-Compl(下);i 到 l 为接种 3 天后拍摄,i 到 k 中显示的 4 行菌落从上到下分别为 KO1,WT,KO1-Compl 和 KO2,l 中显示的菌落从上到下分别为 WT 和 KO1-Compl,i 到 l 中各行大丽轮枝菌孢子的接种密度从左到右依次均为 $1 \times 10^8, 1 \times 10^7, 1 \times 10^6, 1 \times 10^5, 1 \times 10^4$ 和 1×10^3 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 。以上所有实验重复 3 次

图 5 不同胁迫条件下大丽轮枝菌表型分析

Fig. 5 Phenotypic analysis of *V. dahliae* under different stress condition

2.5 丽轮枝菌致病力分析

为分析 *VDmef2* 基因是否与大丽轮枝菌的致病相关,采用灌根法接种大丽轮枝菌到陆地棉幼苗,并分析不同菌株的致病力。接种 15 天后,观察到接种野生型大丽轮枝菌 WT 的陆地棉叶片表现为卷曲、黄化、萎蔫坏死等典型的黄萎病症状(图 6a);接种 KO1 与 KO2 后的陆地棉叶片与接种无菌水(阴性对照)陆地棉叶片表现出的情况类似,均无黄萎病症状(图 6b,c,e);KO1-Compl 恢复了 *VDmef2* 基因敲除转化子的致病能力,导致陆地棉幼苗叶片萎蔫坏死(图 6d)。上述结果表明 *VDmef2* 基因被敲除后导致了大丽轮枝菌突变体致病力丧失,故该基因与大丽轮枝菌的致病力有关。

3 结论与讨论

大丽轮枝菌 *VdMcm1* 属于 *Mcm1* 类 MADS-Box 保守转录因子,研究结果表明该转录因子与大丽轮枝菌产孢、产微菌核、致病及此生代谢调控相关^[30],有关灰霉(*Botrytis cinerea*)的研究也表明 MADS-Box 类转录因子 *Bcmads1* 被敲除后影响了菌丝生长、产菌核及致病力^[31]。与这些研究结果类似,本研究结果则表明大丽轮枝菌

Rlm1 类 MADS-Box 转录因子 *VDmef2* 与大丽轮枝菌微菌核形成相关,*VDmef2* 突变体对 H_2O_2 也更加敏感,同时 *VDmef2* 突变体丧失了对陆地棉的致病力。



图 6 大丽轮枝菌致病力分析

Fig. 6 Pathogenicity analysis of *V. dahliae*

结合已有的研究^[23,25],笔者推测 MADS-Box 转录因子的功能可能与大丽轮枝菌细胞壁的完整性相关。基因芯片分析发现在酿酒酵母中有 25 个受 ScRlm1 蛋白调控的基因,这些基因大多与细胞壁相关成分的合成代谢调控相关,它们可促使新生细胞产生新细胞壁或强化原有细胞的细胞壁以对抗外界压力^[25];而病原菌侵入植物后植物会通过包括活性氧在内的各种防御手段来对抗病原菌^[32]——当面对植物的活性氧防御时,*VDmef2* 突变体生存能力的降低将会导致自身致病力降低。因此,大丽轮枝菌 *VDmef2* 突变体对 H_2O_2 的敏感性可能与自身细胞壁完整性受损有关。

有关大丽轮枝菌微菌核的研究^[33-35]已经表明:在微菌核形成过程中,大丽轮枝菌外层菌丝细胞膨大后会分泌出黑色素粒子来填充细胞间隙,大量黑色素颗粒会成纤维状包裹在菌丝的细胞壁上。在本研究中,由于 *VDmef2* 突变体的细胞壁完整性受损,因此突变体在逆境条件下形成黑色微菌核的能力也有所降低。一些研究结果已经表明,大丽轮枝菌的微菌核形成能力与大丽轮枝菌致病力紧密相关^[23,36-37],而本研究结果也证实了上述研究结果。总之,大丽轮枝菌如果丧失了致病力,其中可能原因在于突变基因影响了大丽轮枝菌细胞壁完整性,进而导致该菌侵入植物的能力或面对植物防御反应时的生存能力有所降低。

参考文献:

- [1] FRADIN E F, THOMMA B P. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7 (2): 71-86.
- [2] ZHANG Z, van ESSE H P, van DAMME M, et al. Ve1-mediated resistance against *Verticillium* does not involve a hypersensitive response in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14 (7): 719-727.
- [3] de JONGE R, van ESSE H P, MARUTHACHALAM K, et al. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (13): 5110-5115.
- [4] LIEBRAND T W, KOMBRINK A, ZHANG Z, et al. Chaperones of the endoplasmic reticulum are required for Ve1-mediated resistance to *Verticillium* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15 (1): 109-117.
- [5] VINING K, DAVIS T. Isolation of a Ve homolog, mVe1, and its relationship to *Verticillium* wilt resistance in *Mentha longifolia* (L.) Huds [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282 (2): 173-184.
- [6] ZHANG B, YANG Y, CHEN T, et al. Island cotton Gbve1 gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae* [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e51091.
- [7] AMYOTTE S G, TAN X, PENNERMAN K, et al. Transposable elements in phytopathogenic *Verticillium* spp.: insights into genome evolution and inter- and intra-specific diversification [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 314.
- [8] KLOSTERMAN S J, SUBBARAO K V, KANG S, et al. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7 (7): e1002137.

- [9] de JONGE R, BOLTON M D, KOMBRINK A, et al. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen[J]. *Genome Research*, 2013, 23(8):1271-1282.
- [10] WANG J Y, CAI Y, GOU J Y, et al. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8):4989-4995.
- [11] ZHOU B J, JIA P S, GAO F, et al. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(7):964-975.
- [12] SANTHANAM P, van ESSE H P, ALBERT I, et al. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(3):278-286.
- [13] GAO F, ZHOU B J, LI G Y, 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.
- [14] KLIMES A, AMYOTTE S G, GRANT S, et al. Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene VDH1[J]. *Fungal Genetics & Biology*, 2008, 45(12):1525-1532.
- [15] KLIMES A, DOBINSON K F. A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*[J]. *Fungal Genetics & Biology*, 2006, 43(4):283-294.
- [16] HOPPENAU C E, VAN-TUAN T, KUSCH H, et al. *Verticillium dahliae* VdTHI4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2014, 108(1):14-22.
- [17] TRAN V T, BRAUS-STROMEYER S A, KUSCH H, et al. *Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots[J]. *New Phytologist*, 2014, 202(2):565-581.
- [18] MARUTHACHALAM K, KLOSTERMAN S J, 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]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 49(3):209-221.
- [19] TIMPNER C, BRAUS-STROMEYER S A, TRAN V T, 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]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2013, 26(11):1312-1324.
- [20] LIU S Y, CHEN J Y, WANG J L, 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.
- [21] TZIMA A K, PAPLOMATAS E J, 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]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2011, 24(1):129-142.
- [22] SANTHANAM P, THOMMA B P. *Verticillium dahliae* Sge1 differentially regulates expression of candidate effector genes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2013, 26(2):249-256.
- [23] JUNG U S, SOBERING A K, ROMEO M J, et al. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3):781-789.
- [24] WATANABE Y, IRIE K, MATSUMOTO K. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1995, 15(10):5740-5749.
- [25] JUNG U S, LEVIN D E. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signaling pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(5):1049-1057.
- [26] DODOU E, TREISMAN R. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(4):1848-1859.
- [27] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21):2947-2948.
- [28] XIE C, LI Q, YANG X. Characterization of VdASP F2 secretory factor from *Verticillium dahliae* by a fast and easy gene knockout system[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2017, 30(6):444-454.
- [29] SHORE P, SHARROCKS A D. The MADS-Box family of transcription factors[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 229(1):1-13.
- [30] XIONG D G, WANG Y L, TIAN L Y, et al. MADS-Box transcription factor VdMcm1 regulates conidiation, microsclerotia formation, pathogenicity, and secondary metabolism of *Verticillium dahliae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1192.
- [31] ZHANG Z, LI H, QIN G, et al. The MADS-Box transcription factor Bemad1 is required for growth, sclerotia pro-

- duction and pathogenicity of *Botrytis cinerea* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 33901.
- [32] TORRES M A, JONES J D G, DANGL J L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens [J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 373-378.
- [33] WHEELER M H, TOLMSOFF W J, MEOLA S. Ultrastructure of melanin formation in *Verticillium-Dahliae* with (+)-scytalone as a biosynthetic intermediate [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1976, 22(5): 702-711.
- [34] GRIFFITHS D A. The fine structure of developing microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb [J]. Archiv für Mikrobiologie, 1970, 74(3): 207-212.
- [35] BROWN M F, WYLLIE T D. Ultrastructure of microsclerotia of *Verticillium Alboatrum* [J]. Phytopathology, 1970, 60(3): 538-542.
- [36] LOPEZ-ESCUADERO F J, ROCA J M, VALVERDE-CORREDOR A, et al. Correlation between virulence and morphological characteristics of microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive [J]. Journal of Phytopathology, 2012, 160(7/8): 431-433.
- [37] TZIMA A, PAPLOMATAS E J, RAUYAREE 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 Genetics & Biology, 2010, 47(5): 406-415.

Functional Identification of *VDmef2* Gene in *Verticillium dahliae* Involved in Stress Resistance and Pathogenicity

XIE Chengjian, YANG Xingyong

(Chongqing Engineering Research Center of Specialty Crop Resources, School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To identify the function of transcription factor *VDmef2* in *Verticillium dahliae*. [Methods] By virtue of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) method, the *VDmef2* gene was knocked out from *V. dahliae*. Fungal growth and susceptibility were analyzed to carbon sources and stress conditions, and it also was determined whether *VDmef2* gene was required for microsclerotial production on MIM. Cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings were infected to evaluate the effect of *VDmef2* gene knockout on virulence. [Findings] Protein subcellular localization suggested *VDmef2* located in the nucleus of *V. dahliae*. Further assessment revealed that the *VDmef2* mutant exhibited a significant delay in microsclerotial formation and was also more sensitive to hydrogen peroxide stress, and showed decreased virulence relative to the wild type strain on cotton. [Conclusions] *VDmef2* is essential for microsclerotia formation, resistance against oxidative stress and the pathogenicity of *V. dahliae*.

Keywords: *VDmef2* gene; MADS transcription factor; *Verticillium dahliae*; oxidative stress; microsclerotia; pathogenicity

(责任编辑 方 兴)