

梁曼, 邓晟, 张昕, 等. 大丽轮枝菌核型菌株 T-DNA 插入突变体库的构建及微菌核发育异常突变体的筛选[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 520-525.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.009

大丽轮枝菌核型菌株 T-DNA 插入突变体库的构建及微菌核发育异常突变体的筛选

梁曼^{1,2}, 邓晟², 张昕², 林玲²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为阐明大丽轮枝菌微菌核形成发育的分子机理, 利用农杆菌介导的遗传转化方法, 建立了包含 2 000 个转化子的大丽轮枝菌核型菌株 V08DF1 的 T-DNA 插入突变体库, 并在查氏、查氏-根或 PDA 培养基上培养, 观察各转化子的菌落形态。从中筛选出 130 个菌落特征与野生型菌株 V08DF1 有明显差异的突变体菌株, 其中 14 个突变体菌株为微菌核发育受阻。对这 14 个微菌核发育异常的突变体菌株进行 T-DNA 插入的 PCR 验证, 均能扩增到潮霉素抗性基因, Southern 杂交显示其中 7 个为单拷贝插入, 5 个为双拷贝插入, 2 个为三拷贝插入, 表明 T-DNA 已经成功整合到这些突变株的基因组 DNA 中。

关键词: 农杆菌介导的转化; 大丽轮枝菌; 突变体库; 微菌核

中图分类号: Q343.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0520-06

Construction of T-DNA inserted transformation library of sclerotium type *Verticillium dahliae* strain and screening of mutants with abnormal micro-sclerotia development

LIANG Man^{1,2}, DENG Sheng², ZHANG Xin², LIN Ling²

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To illustrate the molecular mechanism underlying microsclerotial development in *Verticillium dahliae*, agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT) was applied for insertional mutagenesis of *V. dahliae* conidia. A T-DNA insertion mutant library of a sclerotium-type strain V08DF1 including 2 000 transformants were constructed. All of the 2 000 transformants cultured on two kinds of medium plates (Czapek-Dox medium plate and Czapek-Dox plus cotton root extract medium plate, or Czapek-Dox medium plate and PDA medium plate) were observed for colony morphology. 130 mutants with significant difference in colony morphology from V08DF1 were selected, among which 14 showed abnormal micro-sclerotia development. Southern blot analysis indicated that T-DNAs were inserted randomly into the *V. dahliae* genome

and that seven mutants out of above 14 were single-copy T-DNA insertion, five were two-copy T-DNA insertion, and two were three-copy T-DNA insertion.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation; *Verticillium dahliae*; mutant library; micro-sclerotia

收稿日期: 2015-01-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201462); 国家科技支撑计划项目(2012BAD19B05); 国家现代农业技术体系棉花产业技术体系(CARS-18-16); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)5022]

作者简介: 梁曼(1992-), 女, 安徽六安人, 硕士研究生, 从事大丽轮枝菌微菌核发育分子机理研究。(Tel)025-84390769; (E-mail)liangman19921116@sina.com

通讯作者: 林玲, (E-mail)linling@jaas.ac.cn

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的棉花黄萎病已成为中国棉花生产上的第一大病害, 是棉花可持续生产的主要障碍之一。微菌核是病原菌在土

壤中的主要存活结构和病害的初侵染来源,也是病害防治的直接靶标^[1-2]。因此,明确微菌核形成和发育的机制对于深入研究棉花黄萎病的流行规律和制定防治措施具有重要意义。前人对于大丽轮枝菌微菌核的研究主要集中于微菌核的形态、大小、分布,微菌核的分离培养技术以及影响微菌核萌发与存活的因素等^[2-4]。但是,对于调控大丽轮枝菌微菌核发育的内在分子机理研究的很少。

农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)技术已成为研究真菌基因功能的有效工具之一,通过 ATMT 方法将 T-DNA 随机插入至真菌基因组中构建突变体库,并根据突变体的表型筛选获得相关功能基因,已成功运用于多种植物病原真菌的功能基因研究^[5-7]。江苏省农业科学院植物保护研究所土传种传病害实验室同样用 ATMT 方法,将自己构建的双向 GFP 启动子诱捕载体 1300-bisGFP-hyg 转入大丽轮枝菌菌丝型强致病力菌株 V07DF2 中,构建了包含 6 000 个转化子的 T-DNA 插入突变体库。从其中 60 个转化子中筛选出 6 个丧失致病力和 11 个致病力显著降低的突变体菌株,并对其中 1 个致病力显著降低的突变体菌株 24C9 进行了深入的分析,该菌株为单拷贝 T-DNA 插入,插入位点为 *VdUGPU* 基因(*VDAG_03025*)的启动子区域^[8]。但是从该突变体库中的 1 000 个转化子中仅筛选获得 1 株微菌核发育异常的突变体菌株 43F11,该突变株为双拷贝 T-DNA 插入,在查氏-根培养基上培养一个月后能够产少量黑色微菌核,但在查氏平板上生长与野生型 V07DF2 一致,不产生微菌核。为了获得更多的微菌核发育异常的突变体菌株,就需要进一步扩建大丽轮枝菌 T-DNA 插入突变体库。

由于大丽轮枝菌的菌落形态变异很大,根据在 PDA 培养基上生长时形成微菌核的多少可将大丽轮枝菌分为不产微菌核的菌丝型、产生少量黑色微菌核的中间型和产生大量黑色微菌核的菌核型这 3 种培养类型^[9]。为此,我们用同样的方法,将双向 GFP 启动子诱捕载体 1300-bisGFP-hyg 转入菌核型菌株 V08DF1 中,并同时用 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体转化 V08DF1,构建大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 的突变体库,试图从菌丝型菌株 V07DF2 库中筛选出能够产生微菌核的突变体菌株,并从菌核型菌株 V08DF1 库中找出微菌核

发育受阻的突变体菌株,为进一步克隆微菌核发育相关的基因及揭示微菌核形成和发育的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1,分离自江苏棉花黄萎病病株,保存于江苏省农业科学院植物保护研究所。农杆菌菌株 AGL-1 由江苏省农业科学院农业生物技术研究张保龙研究员惠赠。1300-bisGFP-hyg 双向 GFP 启动子诱捕载体^[8]和 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体^[10]由江苏省农业科学院植物保护研究所保存。

1.1.2 试剂 潮霉素(Hygromycin, hyg)B 和 Southern 杂交试剂盒来源于 Roche 公司。PCR 体系(TransTaq DNA Polymerase High Fidelity)购于北京全式金生物技术有限公司。其他常规试剂及抗生素均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大丽轮枝菌菌株 V08DF1 对潮霉素的耐受性检测 采用 PDA 平板培养,设置潮霉素质量浓度梯度为 0 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、150 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$,每个梯度 3 次重复,接种大丽轮枝菌菌株 V08DF1,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,黑暗培养 14 d,观察菌落生长情况。

1.2.2 农杆菌介导的遗传转化和转化子的保存 农杆菌介导的大丽轮枝菌的转化参见已报道的方法^[8],大丽轮枝菌菌株 V08DF1 分别用 1300-bisGFP-hyg 双向 GFP 启动子诱捕载体和 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体进行转化。挑取在硝酸纤维素膜上长出的转化子,转接至装有含 50 $\mu\text{g/ml}$ 潮霉素 B、200 $\mu\text{g/ml}$ 头孢噻肟和 200 $\mu\text{g/ml}$ 羧苄青霉素的 PDA 的 96 孔平板上,然后对阳性转化子进行单孢分离,−70 $^{\circ}\text{C}$ 保存在含 25% 甘油的 PDA 液体培养基中,即获得了大丽轮枝菌菌株 V08DF1 的 T-DNA 插入转化子。

1.2.3 微菌核发育异常突变体菌株的筛选 对采用 1300-bisGFP-hyg 双向 GFP 启动子诱捕载体构建的 1 000 个转化子用由查氏和查氏-根培养基进行筛选。查氏-根培养基是在传统查氏培养基的基础上加入棉花根物质,具体制备步骤参照 Deng 等^[8]的方法进行,通过启动子捕获模块找到参与微菌核

发育相关的基因。对采用 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体构建的 1 000 个转化子由查氏与 PDA 培养基进行筛选,分别吸取 5 μ l -70 $^{\circ}$ C 保存的转化子,滴在查氏、查氏-根或 PDA 固体培养基的中央,25 $^{\circ}$ C 黑暗培养 30 d,每隔 7 d 观察各转化子的菌落形态,比较其菌落直径、菌丝形态、气生菌丝多少、是否产生色素、是否产生微菌核等培养特性,比较其生物学特性与野生型菌株的差异。从中筛选出产微菌核能力与野生型菌株明显不同的突变体菌株,即找出微菌核发育受阻,不产微菌核的突变体菌株。

1.2.4 微菌核发育异常突变体菌株 T-DNA 插入的 PCR 验证 微菌核发育异常的突变体菌株在 PDA 液体培养基中,25 $^{\circ}$ C、150 r/min,培养 7 d 后,取新鲜菌丝提取基因组 DNA。根据转化载体中 T-DNA 片段上的潮霉素抗性基因设计特异性引物^[11],HYG 检测上游引物:5'-GACAGCGTCTCCGACCTGATGC-3',HYG 检测下游引物:5'-TGGGGCGTCGGTTTCCACTATC-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μ l: H₂O 16.25 μ l、DNA 2.00 μ l、HYG-S 1.00 μ l、HYG-A 1.00 μ l、Buffer I (含 Mg²⁺) 2.50 μ l、dNTP Mixture 2.00 μ l、Taq DNA Polymerase 0.25 μ l;反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.2.5 微菌核发育异常突变体菌株 T-DNA 插入拷贝数的验证 使用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒分析 T-DNA 插入的拷贝数。各步骤均按照试剂盒说明书进行,首先,用 HYG 检测引物扩增 943 bp 潮霉素抗性基因片段用于合成杂交探针,接下来将微菌核发育异常突变体的 gDNA (约 25 μ g) 分别用 *Bst*X I、*Hind* III 37 $^{\circ}$ C 过夜完全酶切,并将酶切产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,然后用毛细管转移法将核酸转移并固定于尼龙膜上,最后,在尼龙膜上进行杂交与显色。

2 结果

2.1 大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 突变体库的构建

在开始进行 ATMT 转化大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 试验之前,先检测菌株 V08DF1 对潮霉素 B

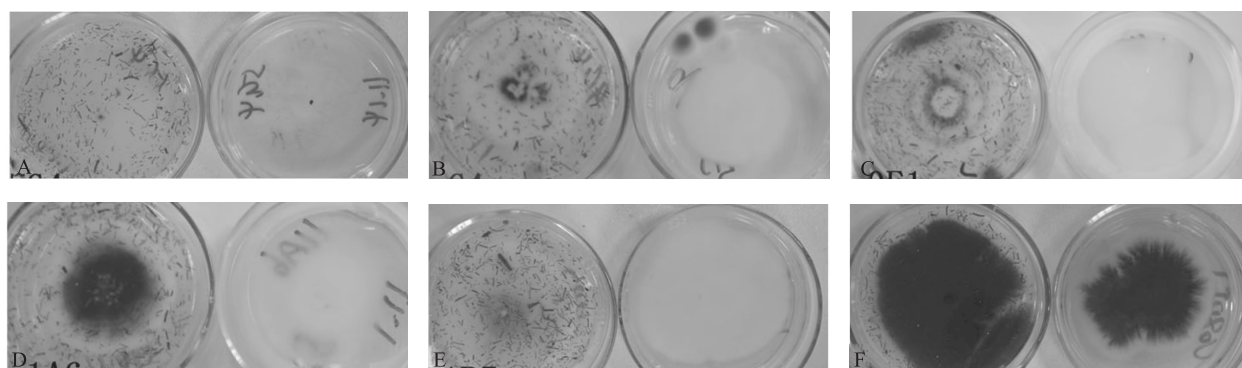
的耐受性。结果显示,于 25 $^{\circ}$ C,在 PDA 培养基上黑暗培养 14 d 后,潮霉素 B 质量浓度梯度为 50 μ g/ml 时,即可抑制 V08DF1 的生长,其对潮霉素 B 耐受性的检测结果与 V07DF2 一致。

采用农杆菌介导的遗传转化对大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 进行转化,转化率为 1.60×10^{-4} 。对转化子进行单孢分离保存,建立了大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 的突变体库,共保存 2 000 个转化子,其中包括用 1300-bisGFP-hyg 双向 GFP 启动子诱捕载体转化获得的 1 000 个转化子,以及用 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体转化获得的 1 000 个转化子。

2.2 转化子菌落形态的观察及微菌核发育异常突变体菌株的筛选

对 1 000 个用 1300-bisGFP-hyg 双向 GFP 启动子诱捕载体进行转化的转化子采用查氏和查氏-根培养基进行培养 14 d 后,观察各转化子的菌落特征,结果显示,41 个突变体菌株的菌落特征与野生型菌株 V08DF1 有明显差异,包括 11 个菌落直径明显变小的突变体菌株,12 个菌落中菌丝稀疏的突变体菌株,12 个没有气生菌丝的突变体菌株,1 个产红色素的突变体菌株和 5 个微菌核发育异常的突变体菌株。在这 5 个微菌核发育异常的突变体菌株中,突变体菌株 5G4 在查氏和查氏-根培养基上培养 14 d 后,均不产生微菌核,而其余 4 个微菌核发育异常突变体菌株 9G4、10E1、11A6、11B7 只在查氏平板上不产生微菌核,而在查氏-根培养基仍然能够产生少量微菌核(图 1)。

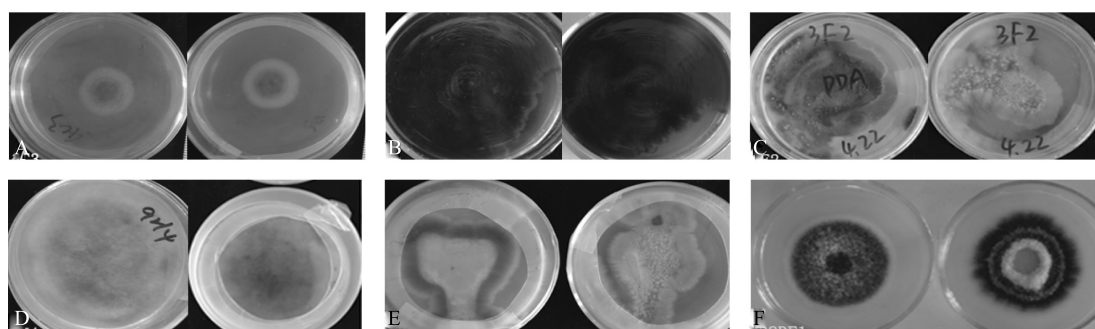
对 1 000 个用 1300-HYG-sGFP 荧光标记载体进行转化的转化子采用 PDA 和查氏培养基进行筛选,培养 14 d 后发现 89 个突变体菌株的菌落特征与野生型菌株 V08DF1 有明显差异,部分菌落形态异常突变体菌株表型如图 2 所示,包括 19 个菌落直径明显变小的突变体菌株,25 个菌落中菌丝稀疏的突变体菌株,27 个没有气生菌丝的突变体菌株,4 个产红色素的突变体菌株,5 个菌丝颜色微黄的突变体菌株和 9 个微菌核发育异常的突变体菌株。在这 9 个微菌核发育异常的突变体菌株中,2H3 和 12I3 这 2 个突变体菌株在 PDA 和查氏平板上培养 14 d 都不产生微菌核,其余 7 个微菌核发育异常突变体菌株 1C2、6I7、7E6、10B5、11C3、11G3、12C8 只在查氏平板上不产生微菌核,而在 PDA 平板上与野生型 V08DF1 一致,产生大量黑色微菌核,部分微菌核异常的突变体菌株表型如图 3 所示。



每张照片左边平板为查氏-根培养基,右边平板为查氏培养基。A:突变体菌株 5G4;B:突变体菌株 9G4;C:突变体菌株 10E1;D:突变体菌株 11A6;E:突变体菌株 11B7;F:野生型菌株 V08DF1。

图1 用查氏和查氏-根培养基筛选 V08DF1 库中微菌核发育异常的突变体菌株

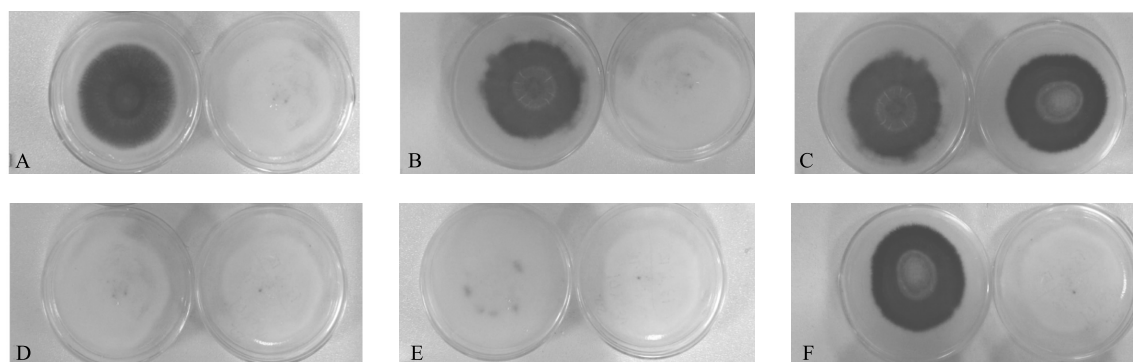
Fig.1 The mutants with abnormal microsclerotia development screened from V08DF1 library on Czapek-Dox medium and Czapek-Dox plus cotton root extract medium



每张照片左边平板为 PDA 培养基,右边平板为查氏培养基。A:突变体菌株 4C3;B:突变体菌株 3C5;C:突变体菌株 3F2;D:突变体菌株 9H4;E:突变体菌株 11C7;F:野生型菌株 V08DF1。

图2 V08DF1 库中菌落形态异常的突变体菌株

Fig.2 The morphological mutants in V08DF1 library



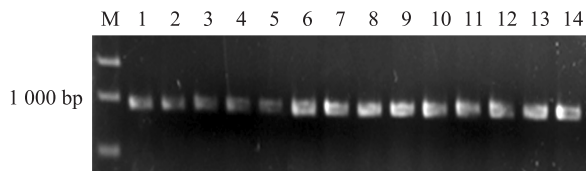
每张照片左边平板为 PDA 培养基,右边平板为查氏培养基。A:突变体菌株 1C2;B:突变体菌株 11C3;C:突变体野生型菌株 V08DF1;D:突变体菌株 2H3;E:突变体菌株 12I3;F:突变体菌株 6I7。

图3 用查氏和 PDA 培养基筛选 V08DF1 库中微菌核发育异常的突变体菌株

Fig.3 The mutants with abnormal microsclerotia development screened from V08DF1 library on PDA medium and Czapek-Dox medium

2.3 微菌核发育异常突变体菌株 T-DNA 插入的 PCR 验证

对筛选出的 14 个微菌核发育受阻, 不产生微菌核的突变体菌株 1C2、2H3、5G4、6I7、7E6、9G4、10B5、10E1、11A6、11B7、11C3、11G3、12C8、12I3 进行 T-DNA 插入的 PCR 验证。以这些突变体菌株的基因组 DNA 为模板, 均能 PCR 扩增出 943 bp 的潮霉素抗性基因(图 4)。由此断定, T-DNA 已经整合到基因组 DNA 中, 成功实现了转化。



M: DNA 分子量标准; 1~14: 微菌核发育异常突变体菌株 1C2、2H3、5G4、6I7、7E6、9G4、10B5、10E1、11A6、11B7、11C3、11G3、12C8、12I3。

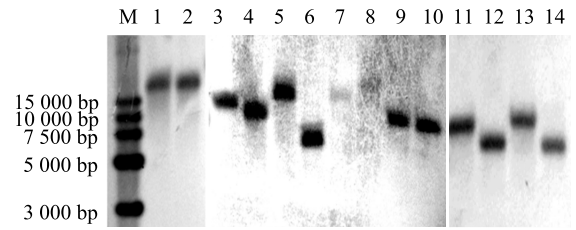
图 4 PCR 检测微菌核发育异常突变体菌株的潮霉素抗性基因
Fig. 4 Detection of hygromycin B resistance gene in the mutants with abnormal microsclerotia development by PCR amplification

2.4 微菌核发育异常突变体 T-DNA 插入拷贝数的验证

通过 Southern 杂交对筛选出的 14 个微菌核发育异常的突变体菌株进行 T-DNA 插入拷贝数的验证。结果显示, 7 个微菌核发育异常的突变体菌株为单拷贝, 分别为 1C2、2H3、6I7、10B5、10E1、12C8、12I3; 5 个为双拷贝, 分别为 5G4、7E6、9G4、11C3、11G3; 2 个为三拷贝, 分别为 11A6、11B7。单拷贝插入的微菌核异常突变体菌株的 Southern 杂交结果如图 5 所示。

3 讨论

最近几年来, 随着大丽轮枝菌基因组序列的测定和基因表达信息的丰富, 系统插入突变技术、基因敲除技术的应用, 极大推动了大丽轮枝菌微菌核形成发育分子机制的研究, 但总体仍处于起步阶段。目前, 已报道的与微菌核发育相关的基因只有为数不多的几个, 并且大多与致病性相关。通过基因敲除验证, 发现参与大丽轮枝菌微菌核发育并且与致



M: DNA 分子量标准。1~2、3~4、5~6、7~8、9~10、11~12、13~14: 微菌核发育异常突变体菌株 6I7、10B5、10E1、12C8、12I3、1C2 和 2H3 基因组分别用 *Bst*X I、*Hind* III 酶切后产生的条带。

图 5 微菌核发育异常突变体菌株的 Southern 杂交分析

Fig. 5 Southern-blot analysis of T-DNA insertion in the mutants with abnormal microsclerotia development

病性相关的基因有 7 个, 分别为 *VMK1* (编码促分裂素原活化蛋白激酶)^[12]、*VdPKAC1* (编码 cAMP 依赖性蛋白激酶 A 的催化亚基)^[11,13]、*VdGARPI* (编码 1 个富含谷氨酸的蛋白质)^[14]、*VdSNF1* (编码蔗糖非发酵蛋白质激酶)^[15]、*VGB* (编码 G 蛋白质的 β 亚基)^[16]、*Vta2* (编码粘附的转录激活因子)^[17] 和 *VdMsb* (编码 1 种跨膜粘蛋白)^[18]。另外还有 1 个基因 *VMK1* (编码 1 种真菌疏水蛋白质) 参与了大丽轮枝菌微菌核的形成, 但不是致病必需的因子^[19-20]。目前已经发现的这些基因仅仅揭开了大丽轮枝菌微菌核发育机制的冰山一角, 外界环境和内在因子引发大丽轮枝菌微菌核发育的途径、靶标位点以及作用方式都还需要进一步揭示。

正向遗传学途径研究基因功能的方法是在获得功能丧失突变体的基础上分离和鉴定控制该表型的基因。我们通过 ATMT 方法将 T-DNA 随机插入至大丽轮枝菌基因组中, 建立了大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 的 T-DNA 插入突变体库, 从 2 000 个转化子中筛选出 14 个微菌核发育异常的突变体菌株, 表明这些突变体菌株中与微菌核形成发育相关的基因, 被 T-DNA 的插入破坏了。进一步通过 Southern 杂交, 筛选出 7 个单拷贝插入的突变体菌株 1C2、2H3、6I7、10B5、10E1、12C8 和 12I3, 表明这 7 个被 T-DNA 插入破坏的基因是大丽轮枝菌微菌核形成发育过程中的关键基因, 这些突变体菌株是研究大丽轮枝菌微菌核形成发育机制的好材料。

参考文献:

- [1] 林玲, 张昕, 邓晟. 棉花黄萎病研究进展[J]. 棉花学

- 报, 2014, 26(3): 260-267.
- [2] ISAAC I, MACGARVIE Q D. Germination of resting bodies in *Verticillium* species[J]. Nature, 1962, 195: 826-827.
- [3] 杨家荣, 商鸿生, 高立强. 土壤环境因素对棉花黄萎病菌微菌核存活的影响[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 180-183.
- [4] WILHELM S. Longevity of the *Verticillium wilt* fungus in the laboratory and field[J]. Phytopathology, 1955, 45: 180-181.
- [5] CHEN X L, YANG J, PENG Y L. Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 722: 213-224.
- [6] MULLINS E D, CHEN X, ROMAINE P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer[J]. Phytopathology, 2001, 91(2): 173-180.
- [7] 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.
- [8] DENG S, WANG C, ZHANG X, et al. Bidirectional promoter trapping T-DNA for insertional mutagenesis in *Verticillium dahliae* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2014, 60(7): 445-454.
- [9] 宋晓轩, 朱荷琴, 郭金城. 棉花黄萎病 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 安阳菌系致病力分化研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(1): 13-18.
- [10] 邓 晟, 王彩月, 张 昕, 等. 大丽轮枝菌的绿色荧光蛋白标记[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1197-1199.
- [11] 邓 晟, 张 昕, 林 玲. 蛋白激酶 A 催化亚基 VdPKAC1 对菌丝型大丽轮枝菌 V07DF2 培养性状及致病力的调控[J]. 中国农业科学, 2014, 47(17): 3382-3391.
- [12] RAUYAREE P, OSPINA-GIRALDO M D, KANG S, et al. Mutations in *VMK1*, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae* [J]. Current Genetics, 2005, 48(2): 109-116.
- [13] TZIMA A K, 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 and Biology, 2010, 47: 406-415.
- [14] GAO F, ZHOU B, 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: e15319.
- [15] TZIMA A K, PAPLOMATAS E J, RAUYAREE P, et al. *Vd-SNF1*, 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 Interactions, 2011, 24: 129-142.
- [16] TZIMA A K, PAPLOMATAS E J, TSITSIGIANNIS D I, et al. The G protein β subunit controls virulence and multiple growth- and development-related traits in *Verticillium dahliae* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(4): 271-283.
- [17] TRAN V T, BRAUS-STROMEYER S A, KUSCH H, et al. *Verticillium* transcription activator of adhesion *Via2* suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots[J]. New Phytologist, 2014, 202(2): 565-581.
- [18] 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: 238-244.
- [19] 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 and Biology, 2006, 43: 283-294.
- [20] 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 and Biology, 2008, 45: 1525-1532.

(责任编辑:袁 伟)