

分类号: Q93  
学号: 20222006050

密级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学 硕士学位论文



## 大丽轮枝菌细胞壁降解酶编码基因 *VdCut1* 和 *VdPL16* 的功能研究

学位申请人	刘改杰
指导教师	王爱英 教授
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	微生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子  
2026年5月

分类号: Q93  
学号: 20222006050

密级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文

### 大丽轮枝菌细胞壁降解酶编码基因 *VdCut1* 和 *VdPL16* 的功能研究

学位申请人	刘改杰
指导教师	王爱英 教授
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	微生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子  
2026年5月

**Function Study of Cell Wall-Degrading Enzyme Encoding Genes**

***VdCut1 and VdPL16 in Verticillium dahliae***

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Natural Science**

By

**Liu Gaijie**

**(Biology)**

Dissertation Supervisor: Prof. Wang Aiying

May, 2026

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：刘汉杰

时间：2026年5月20日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：刘汉杰

时间：2026年5月20日

导师签名：

谭英

时间：2026年5月20日

## 摘要

新疆棉花种植面积与总产量在全国均占据显著优势，但集约化种植模式也导致棉花黄萎病频发，严重影响了部分生态适宜区的棉花产量与品质。棉花黄萎病由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 侵染引起，该病原菌为典型土传性维管束真菌，其不同菌系及生理小种间致病力分化显著，这也是长期以来黄萎病防控难以取得突破性进展的关键原因。

目的：为明确大丽轮枝菌的致病关键因子，解析植物细胞壁降解酶 (PCWDEs) 与致病力的关系，本研究以致病力差异显著的大丽轮枝菌菌株为材料，通过基因组测序与注释分析，比较两菌株毒力基因差异，筛选关键致病相关基因，探究靶标基因对菌株生长、胁迫耐受性及致病性的调控作用，阐明其致病分子机制，为棉花黄萎病防控提供理论依据。

方法：(1) 对致病性差异的 2 个菌株进行基因组测序；(2) 结合碳水化合物活性酶 (CAZymes) 功能注释信息，筛选调控病原菌致病能力的关键毒力基因。(3) 对靶标基因开展生物信息学分析，并验证其蛋白分泌活性及侵染棉花过程中的表达模式；(4) 利用农杆菌介导同源重组技术，构建基因敲除突变体与回补菌株，系统测定菌株生长繁殖能力、非生物胁迫耐受性及致病力差异，综合分析靶标基因的致病功能。

结果：(1) 基因组测序及比较分析发现两菌株间的 CAZy 超家族的整体组成及数量分布高度保守。结合 PHI-base 同源比对，从 VdSHZ-9 (高致病力) 与 VdSHZ-4 (低致病力) 菌株中，分别鉴定出 105 个和 101 个 PHI (病原菌-宿主互作) 蛋白。比较分析显示，两菌株间有 5 个基因表现出不一致的致病力注释。其中，PCWDEs 相关基因 *VdCut1* (A6444 PHI:2383) 和 *VdPL16* (A0452 PHI:4619) 与 VdSHZ-9 的菌株致病力相关，但对 VdSHZ-4 的致病力无影响。

(2) 生物信息学预测显示，*VdCut1* 编码蛋白 N 端含 19 个氨基酸信号肽及  $\alpha/\beta$  水解酶超家族结构域，*VdPL16* 编码蛋白 N 端含 20 个氨基酸信号肽及 PL-6 超家族 Amb\_all 结构域；经验证，两基因 N 端信号肽均具有分泌活性，且二者在大丽轮枝菌侵染棉花根系早期 (12-24 hpi) 表达量显著上调，推测这两个 PCWDEs 相关基因在菌株侵染初期发挥关键作用。

(3) 通过农杆菌介导的同源重组技术，获得高致病力菌株 *VdCut1* 与 *VdPL16* 的基因敲除突变体 ( $\Delta VdCut1$ 、 $\Delta VdPL16$ ) 及对应回补菌株。形态学特征表明，与野生型菌株相比，敲除突变体的菌落生长速率显著减慢，分生孢子产量大幅降低，表明这两个基因正向调控大丽轮枝菌的营养生长及无性繁殖。

(4) 胁迫与侵染功能分析显示，敲除 *VdCut1* 或 *VdPL16* 后，突变体对高渗、氧化胁迫等非生物逆境的敏感性显著增强，穿透玻璃纸的物理屏障突破能力明显减弱。EGFP 荧光标记菌株侵染棉花根部试验显示，突变体菌丝在棉花根部维管组织中的定殖能力显著受阻，导致菌株致病力显著下降、病情指数明显降低。

结论：上述结果初步表明，强、弱致病力菌株的 CAZy 家族组成与 PCWDEs 总量无显著差异，并非毒力分化的关键；在强致病菌株中，敲除 *VdCut1* 和 *VdPL16* 基因，可显著减弱大丽轮枝菌对棉花根部的初始穿透能力，进而降低其整体致病性。推测，不同菌株 PCWDEs 基因的功能差异，是导致菌株毒力分化的重要原因。

**关键词：**棉花黄萎病；碳水化合物活性酶；致病性；植物细胞壁降解酶；基因敲除

## Abstract

Xinjiang boasts obvious advantages in both planting area and total yield of cotton in China. However, the intensive cultivation model has led to the frequent occurrence of cotton verticillium wilt, which severely affects cotton yield and quality in some ecologically suitable regions. Cotton verticillium wilt is caused by *Verticillium dahliae*, a typical soil-borne vascular fungus. There exists significant pathogenicity differentiation among different strains and physiological races of this pathogen, which is the key reason for the long-term lack of breakthroughs in verticillium wilt control.

Objective: This study aimed to identify the key pathogenicity factors of *V. dahliae* and clarify the relationship between plant cell wall degrading enzymes (PCWDEs) and pathogenicity. Using two *V. dahliae* strains with distinct pathogenicity as materials, we compared virulence gene differences via genomic sequencing and annotation, screened key pathogenicity-related genes, explored the regulatory roles of target genes in strain growth, stress tolerance and pathogenicity, and elucidated the molecular pathogenic mechanism, so as to provide a theoretical basis for the control of cotton verticillium wilt.

Methods: (1) Genome sequencing was performed on two *V. dahliae* strains with differential pathogenicity. (2) Key virulence genes were screened based on CAZy annotation results. (3) Bioinformatics analysis was carried out on target genes, and their protein secretion activity and expression patterns during cotton infection were verified. (4) Gene knockout mutants and complementary strains were constructed using *Agrobacterium*-mediated homologous recombination. The growth and reproduction capacity, abiotic stress tolerance and pathogenicity of these strains were systematically determined to comprehensively analyze the pathogenic functions of target genes.

Results: (1) Genomic comparison revealed that the overall composition and quantity distribution of CAZy superfamilies were highly conserved between the two strains. Based on homologous alignment against PHI-base, 105 and 101 pathogen-host interaction (PHI) proteins were identified in highly virulent strain VdSHZ-9 and weakly virulent strain VdSHZ-4, respectively. Comparative analysis showed inconsistent pathogenicity annotations for 5 genes between the two strains. Among them, two

PCWDEs-related genes, *VdCut1* (A6444 PHI:2383) and *VdPL16* (A0452 PHI:4619), were associated with the pathogenicity of VdSHZ-9 but exerted no effect on that of VdSHZ-4.

(2) Bioinformatics prediction showed that the *VdCut1*-encoded protein contained a 19-amino-acid signal peptide at the N-terminus and an  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily domain, while the *VdPL16*-encoded protein harbored a 20-amino-acid signal peptide and an Amb\_all domain of the PL-6 superfamily. Both signal peptides were verified to have secretion activity. Additionally, the transcript levels of *VdCut1* and *VdPL16* were significantly upregulated at the early stage of cotton root infection (12–24 hpi), suggesting that these two PCWDEs-related genes play critical roles in the initial infection stage.

(3) Knockout mutants (*ΔVdCut1*, *ΔVdPL16*) and corresponding complementary strains of the highly virulent isolate were successfully obtained via Agrobacterium-mediated homologous recombination. Phenotypic assays demonstrated that, compared with the wild-type strain, the knockout mutants exhibited significantly reduced colony growth rate and drastically decreased conidial production, indicating that these two genes positively regulate the vegetative growth and asexual reproduction of *V. dahliae*.

(4) Stress and infection functional analysis revealed that deletion of *VdCut1* or *VdPL16* significantly increased the sensitivity of mutants to abiotic stresses such as high osmotic and oxidative stresses, and markedly weakened the ability to penetrate cellophane membranes. Infection assays using EGFP-labeled strains showed that the colonization ability of mutant hyphae in cotton root vascular tissues was significantly inhibited, resulting in remarkably reduced pathogenicity and disease index.

In summary, the composition of the CAZy family and the total number of PCWDEs showed no significant difference between high- and low-virulence strains, which was not the determinant of virulence differentiation. In the highly virulent strain, knockout of *VdCut1* and *VdPL16* significantly impaired the initial penetration ability of *V. dahliae* into cotton roots, thereby reducing its overall pathogenicity. It is speculated that the functional differences in PCWDE genes among different strains are an important cause of virulence differentiation.

**Key words:** Cotton Verticillium wilt; Carbohydrate-active enzymes; Pathogenicity; Plant cell wall-degrading enzymes; Gene knockout

# 目录

摘 要 .....	I
Abstract .....	III
目录 .....	V
中英文缩写词表 .....	VIII
第 1 章 文献综述 .....	1
1.1 棉花黄萎病及其危害 .....	1
1.2 大丽轮枝菌概述 .....	1
1.2.1 大丽轮枝菌的发生及生理特性 .....	1
1.2.2 大丽轮枝菌对棉花的侵染过程与致病特征 .....	2
1.3 大丽轮枝菌致病机理研究 .....	3
1.3.1 大丽轮枝菌致病相关基因 .....	3
1.3.2 分泌蛋白与黄萎病致病机理 .....	4
1.3.3 细胞壁降解酶 (PCWDEs) 致病性研究 .....	6
1.4 植物病原菌基因组学研究进展 .....	7
1.5 研究目的及技术路线 .....	8
1.5.1 研究目的 .....	8
1.5.2 技术路线 .....	9
第 2 章 PCWDEs 基因的筛选及表达特性分析 .....	10
2.1 试验材料 .....	10
2.1.1 植物材料与试验数据 .....	10
2.1.2 试验仪器 .....	10
2.1.3 试验试剂 .....	10
2.2 试验方法 .....	11
2.2.1 真菌的纯化与培养 .....	11
2.2.2 基因组测序 .....	11
2.2.3 PCWDEs 基因的鉴定及生物信息学分析 .....	11
2.2.4 棉花诱导下目的基因表达模式分析 .....	12
2.2.5 不同碳源培养的表达分析 .....	13
2.3 试验结果 .....	14
2.3.1 基因组概况 .....	14

2.3.2	大丽轮枝菌的 CAZymes 家族分析 .....	15
2.3.3	大丽轮枝菌 PCWDEs 的鉴定 .....	15
2.3.4	VdSHZ-9 与 VdSHZ-4 PHI 基因比较及目的基因鉴定 .....	17
2.3.5	目的基因在碳源及棉花诱导下表达模式分析 .....	18
2.4	结论与讨论 .....	19
第 3 章	目的基因的敲除、回补及信号肽分泌功能验证 .....	21
3.1	试验材料 .....	21
3.1.1	菌株与载体 .....	21
3.1.2	试验试剂 .....	21
3.2	试验方法 .....	22
3.2.1	敲除载体的构建 .....	22
3.2.2	回补载体与 EGFP 表达载体的构建 .....	24
3.2.3	目的基因信号肽分泌活性检测 .....	25
3.3	试验结果 .....	26
3.3.1	基因敲除载体的构建 .....	26
3.3.2	农杆菌介导大丽轮枝菌的遗传转化 .....	28
3.3.3	基因敲除转化子的鉴定 .....	28
3.3.4	功能互补及 EGFP 表达载体的构建 .....	29
3.3.5	功能互补突变体及 EGFP 标记菌株的获得 .....	30
3.3.6	信号肽分泌功能验证 .....	31
3.4	结论与讨论 .....	32
第 4 章	突变体菌株生物学性状和致病力测定 .....	33
4.1	试验材料 .....	33
4.1.1	试验菌株及棉花品种 .....	33
4.2	试验方法 .....	33
4.2.1	菌落生长速度和产孢量的测定 .....	33
4.2.2	不同碳源培养基中生长情况分析 .....	33
4.2.3	应对不同胁迫能力检测 .....	33
4.2.4	玻璃纸穿透力测定 .....	34
4.2.5	致病力测定 .....	34
4.2.6	大丽轮枝菌菌丝侵染能力检测 .....	34
4.2.7	数据分析 .....	34
4.3	试验结果 .....	35
4.3.1	菌落表型观察及生长速度测定 .....	35

4.3.2 突变体菌株产孢量的测定 .....	36
4.3.3 碳源利用能力检测 .....	37
4.3.4 渗透压胁迫与细胞壁完整性 (CWI) 检测 .....	38
4.3.5 菌丝穿透能力检测 .....	40
4.3.6 致病力鉴定 .....	41
4.3.7 大丽轮枝菌对维管组织的侵染 .....	43
4.4 结论与讨论 .....	44
第 5 章 结论及展望 .....	46
5.1 结论 .....	46
5.2 展望 .....	46
参考文献 .....	48
附录 .....	58
附表 .....	64
致谢 .....	66
作者简介 .....	67

## 中英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AS	Acetosyringone	乙酰丁香酮
Kan	Kanamycinsulfate	硫酸卡那霉素
F2dU	5-Fluoro-2'-Deoxyuridine	5-氟尿嘧啶
Hyg	Hygromycin	潮霉素
Cef	Cefalothinsodium	头孢霉素钠
Rif	Rifampicin	利福平
CAZy	Carbohydrate-active enzymes database	碳水化合物活性酶数据库
PCWDES	Plant cell wall degrading enzymes	植物胞壁降解酶
qPCR	Real-time Quantitative PCR Detecting System	实时荧光定量聚合酶链式反应
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymera sechain reaction	聚合酶链式反应
PHI	Pathogen-host interaction database	病原寄主互作数据库
PDA	PotatoDextroseAgar	马铃薯琼脂葡萄糖培养基
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid	2-N-吗啡啉乙磺酸
IM	Introduction medium	诱导培养基
CM	Complete medium	完全培养基
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强型绿色荧光蛋白
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns	病原菌相关分子模式
DI	Disease index	病情指数
bp	Basepairs	碱基对
ATMT	Agrobacterium tumefaciens Mediated Transformation	农杆菌介导的遗传转化
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框

## 第 1 章 文献综述

### 1.1 棉花黄萎病及其危害

陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 作为我国第二大农作物, 是重要的战略物资, 在国民经济中起着不可或缺的重要作用<sup>[1]</sup>。棉花黄萎病是由黄萎病菌引起的全球性土传维管束真菌病害, 其致病菌主要包括黑白轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum*) 和大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)。上世纪中后期以前, 人们普遍认为黑白轮枝菌是引起我国棉花黄萎病的唯一病原菌, 随着研究的深入, 发现我国棉花黄萎病的发生都是由大丽轮枝菌所引起<sup>[2]</sup>。自 1914 年首次在美国弗吉尼亚州发现黄萎病以后, 其在包括中国在内的数十个国家和地区广泛传播, 对棉花产量造成巨大损失, 成为棉花高产稳产的主要障碍<sup>[3]</sup>。

棉花黄萎病的发生主要由于上世纪 30 年代引进美国的斯字棉种携带黄萎病菌所致, 之后蔓延至各个棉区<sup>[4]</sup>。新疆作为我国棉花产业的核心区域, 黄萎病最早发现于 1963 年南疆莎车县。大丽轮枝菌存在落叶型与非落叶型两大生理类型, 其中落叶型菌系致病力最强, 侵染寄主后可诱导棉花叶片快速脱落, 危害程度远高于仅造成植株黄化萎蔫的非落叶型菌系<sup>[5]</sup>。20 世纪 90 年代新疆棉区尚未发现强致病力的落叶型菌系, 后续因缺乏科学的引种策略及长期的连续耕作, 棉田中病原菌逐渐累积增多, 受病害影响的棉田面积已超过棉花总种植面积的一半, 轻则减产 10%, 严重时甚至减产 30% 至 50%<sup>[6,7]</sup>。2008 年对新疆南部与北部棉区的黄萎病检测结果表明, 具有最强致病能力的落叶型菌株在南部棉区占比达到了 33.3%, 而北部棉区高达 39.0%。自 2015 年后致病力最强的落叶型菌系占分离菌系数量已高达 53.2%<sup>[8]</sup>, 这一现象已成为阻碍新疆棉花产业持续健康发展的关键因素。

据统计, 大丽轮枝菌可侵染超过 600 种植物并引发黄萎病, 其中感病农作物达 180 余种, 且寄主范围仍呈进一步扩大趋势<sup>[9]</sup>, 感病植株根、茎切面可见典型褐色病斑, 严重时组织水渍状溃烂, 叶片保持挺立、仅边缘褪绿, 后期逐渐萎蔫死亡<sup>[11]</sup>。棉花黄萎病危害严重、分布广泛, 且缺乏理想的防控措施, 因此被称为棉花的“癌症”<sup>[12]</sup>。

### 1.2 大丽轮枝菌概述

#### 1.2.1 大丽轮枝菌的发生及生理特性

棉花黄萎病致病菌为大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*), 属于半知菌亚门轮枝菌属

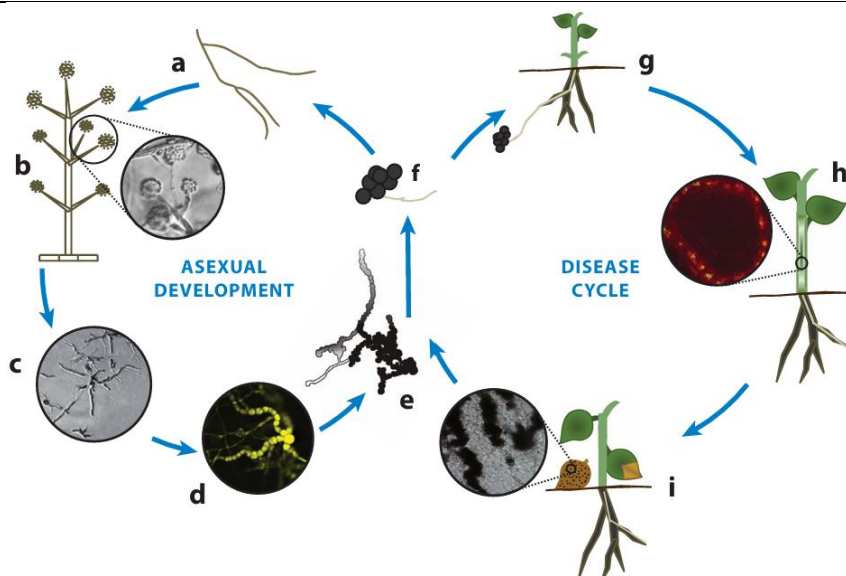
真菌<sup>[13]</sup>，其菌丝具有多个细胞核，生命周期中主要呈现四种形态，分别为分生孢子、分生孢子梗、菌丝和微菌核；分生孢子梗呈轮状分枝，产孢细胞基部略膨大以顶部出芽的方式产生分生孢子；分生孢子卵形长且无色<sup>[14]</sup>，当孢子长至成熟阶段，从芽颈处自动脱落并分散在培养基表面萌发并产生菌丝，菌丝呈透明状，有隔膜；当大丽轮枝菌处于逆境时或生长成熟进入衰老期时，菌丝聚集成团状，同时细胞壁逐渐加厚，黑色素积累形成 30~50  $\mu\text{m}$  长条形或近球形微菌核，这一独特结构加强了微菌核在不利环境下极强的生存能力，在没有寄主条件下存活长达 14 年<sup>[15]</sup>。

土壤含菌量高低、品种抗病性强弱、病原菌致病力差异及耕作栽培措施，均对棉花黄萎病的发生发展具有重要影响，此外，适宜的气候也是黄萎病发生流行的重要因素。大丽轮枝菌在 10°C-30°C 范围内均可生长<sup>[16]</sup>，最适生长温度为 20°C-25°C，在该范围内大丽轮枝菌能够迅速繁殖<sup>[17]</sup>，低于 25°C，或高于 30°C 时，发病症状缓慢，当超过 35°C 时症状短暂隐蔽。此外微菌核具有极强耐高温特性，在 45°C 和 50°C 条件下处理 1440 min 后，仍有少量微菌核可存活<sup>[18]</sup>。研究表明，当土壤中大丽轮枝菌微菌核密度达到 0.03 个/g 时，即可诱发棉花黄萎病；当密度超过 3.5 个/g 时，棉花黄萎病发病率可高达 100%<sup>[19]</sup>。

### 1.2.2 大丽轮枝菌对棉花的侵染过程与致病特征

赵凤轩等成功构建了携带绿色荧光蛋白标记的大丽轮枝菌菌株 Vd-gfp，并借助显微观察系统解析了该菌株对植物根部的侵染动态过程<sup>[20]</sup>。在大丽轮枝菌侵染棉花过程中，分生孢子、菌丝及微菌核均可作为初侵染源，主要从寄主根毛区或根部伤口侵入。孢子附着于根表皮后随即萌发，胚芽管沿根表皮纵向延伸生长，部分菌丝膨大分化形成附着枝，并在表皮细胞间隙处穿透形成侵染钉（Penetration peg），完成对宿主根部的初始侵入<sup>[21]</sup>。成功穿透根表皮后，大丽轮枝菌菌丝在根细胞间隙大量增殖，并借助寄主植株的蒸腾拉力在体内向上扩散，逐步定殖于维管束系统，最终实现对棉花的系统性侵染<sup>[22]</sup>。

大量菌丝与分生孢子可诱导寄主薄壁细胞产生侵填体与胶质物质，严重阻碍水分及养分的正常运输<sup>[23]</sup>；同时，病原菌分泌的果胶酶等细胞壁降解酶可降解寄主细胞壁果胶成分，进一步加剧维管束堵塞<sup>[24]</sup>，多重因素共同作用导致植株生长矮小、叶片萎蔫坏死，最终表现出典型黄萎病症状。当植物组织坏死至一定程度后，病原菌会伴随植株组织崩解形成大量微菌核<sup>[25]</sup>，随病株残体落入土壤并越冬休眠，成为下一季侵染源，继续侵染周边健康植株，致使病害逐年累积流行（图 1-1）<sup>[26]</sup>。因此，建立快速、灵敏、准确的土壤大丽轮枝菌检测技术，对棉花黄萎病的早期监测、预警与绿色防控具有重要意义。

图 1-1 大丽轮枝菌发育及侵染循环过程<sup>[27]</sup>Fig.1-1 Development and disease cycle of *Verticillium dahliae*

### 1.3 大丽轮枝菌致病机理研究

近年来，科研人员围绕大丽轮枝菌的致病机制，重点从组学研究（基因组学、蛋白质组学、转录组学和代谢组学）、致病基因筛选与鉴定，以及寄主与病原菌的相互作用等角度开展了大量研究<sup>[28,29]</sup>。然而，关于致病基因如何具体介导萎蔫症状发生的分子机制，目前依然缺乏明确结论<sup>[30]</sup>。当前对于致病相关基因的功能解析及其致病机理的研究主要聚焦于两大领域：一方面是分泌蛋白类因子，包括参与细胞壁降解的酶类（PCWDEs）和非酶类分泌蛋白；另一方面则聚焦于调控表达的关键分子，包括转录因子、蛋白激酶以及与信号转导相关的受体等<sup>[31,32]</sup>。对这类功能基因开展深入研究，不仅能更为系统地阐明大丽轮枝菌的致病机理，也可为棉花黄萎病生物防控策略的构建提供重要理论支撑<sup>[33]</sup>。

#### 1.3.1 大丽轮枝菌致病相关基因

大丽轮枝菌致病机理非常复杂，其致病能力的发挥受生物因素及外界环境条件等的影响，其致病过程涉及许多生长发育相关基因和致病相关基因<sup>[34]</sup>。大丽轮枝菌中性海藻糖酶基因 *VdPT1* 是其生长与毒力所必须的，该基因缺失导致突变体菌落产生数量减少，菌丝生长和分生孢子萌发延迟并影响菌丝穿透能力<sup>[35]</sup>。乙酰乳酸合酶调节亚基和催化亚基基因 *VdILV6* 在大丽轮枝菌孢子形成过程中发挥重要作用，敲除突变体的分生孢子形态和菌丝穿透能力存在缺陷<sup>[36]</sup>。跨膜蛋白 *VdPls1* 可通过调控 *VdNoxB* 的定位，激活 ROS 信号，并进一步调控  $Ca^{2+}$  信号通路，进而参与病原菌穿透钉的形成过程。该基因敲除后，

会显著影响大丽轮枝菌对寄主的早期定殖<sup>[37]</sup>。细胞骨架蛋白 *VdSep5* 是大丽轮枝菌附着枝衍生形成茎环（即菌丝与病原菌的穿透界面）过程中不可或缺的关键因子，而茎环是分泌蛋白能够分泌的重要场所，缺失 *VdSep5* 能够造成大丽轮枝菌毒力的显著降低或丧失<sup>[38]</sup>。另外还可以通过调控下游靶标基因的表达来调控菌株的致病力<sup>[39]</sup>，大丽轮枝菌 *bZIP* 转录因子 *VdAtf1*，通过与其他转录因子等相互作用，从而调节基因表达的启动和抑制，既可以起到转录激活的作用，也可以起到转录抑制的作用。通过 T-DNA 随机插入技术筛选得到转铁蛋白编码基因 *VdFTF1*，该基因缺失不影响大丽轮枝菌菌丝生长与分生孢子发育，但显著减弱菌株对棉花的致病性。进一步研究表明，*VdFTF1* 可参与调控 43 个潜在致病性相关 PCWDEs 基因的表达水平，进而显著影响大丽轮枝菌的毒力<sup>[25]</sup>。*VdAtf1* 通过介导氮代谢来调节其自身毒力，缺失 *VdAtf1* 会导致病原菌的侵染能力和氮代谢活性的降低，从而减弱其对寄主植物的致病力<sup>[40]</sup>。

微菌核是棉花黄萎病的主要初侵染源，对病害发生具有决定性影响，其源于菌丝细胞的膨大变形，最终形成黑色、近圆形的微小颗粒<sup>[41,42]</sup>。大量的黑色颗粒累呈现出纤维状的集合形态，并紧密地附着包裹于菌丝细胞壁上，它是保护真菌免受各种生物及非生物胁迫的重要毒力因子<sup>[43]</sup>。研究表明聚酮合成酶基因 *VdPKSI* 是黑色素合成途径的关键酶，并参与了分生孢子的形成，*VdPKSI* 敲除后，大丽轮枝菌微菌核黑色素无法正常合成并影响微菌核的形状和发育，降低大丽轮枝菌的毒力<sup>[44]</sup>。编码分泌蛋白基因 *VdASP* 与微菌核的形成时间相关，该基因被敲除或者沉默后延长微菌核的形成时间<sup>[45]</sup>；编码转录因子基因，如 *VdMcm1*、*Vdcpf*、*Vst1* 这些基因敲除后都会导致大丽轮枝菌微菌核的形成受阻<sup>[46-48]</sup>。研究发现，真菌特异性转录因子编码基因 *Vdcpf* 与大丽轮枝菌生长发育密切相关，该基因发生突变后，菌株不再产生微菌核，而是形成膨大、厚壁且透明的菌丝体，且无黑色素合成，与之相关的黑色素合成基因表达量显著降低<sup>[49]</sup>。

上述研究结果揭示大丽轮枝菌侵染寄主是一个复杂的生物学过程，依赖于致病相关基因表达调控、信号转导、能量代谢等相关基因的参与<sup>[50]</sup>。这些发现为深入理解大丽轮枝菌的致病机制奠定了理论基础，也让我们初步认识到寄主与病原菌之间复杂的互作关系。

### 1.3.2 分泌蛋白与黄萎病致病机理

分泌蛋白是一类携带 N 端信号肽、可转运至胞外的真核生物大分子，部分具有酶活性，在寄主-大丽轮枝菌互作中发挥多方面重要作用，例如降解植物细胞壁、抑制植物防卫反应关键信号分子——水杨酸的合成，或作为毒力因子改变植物细胞骨架及细胞核结构等<sup>[51]</sup>。现有研究已对大丽轮枝菌中调控植物防卫反应的分泌效应子基因进行了初步解析。如田李等从大丽轮枝菌全基因组序列中分析预测出编码小分子量富含半胱氨酸蛋