

FocVel2 基因对黄瓜枯萎病菌丝生长及毒力的影响

冯宝珍, 李培谦*

(运城学院生命科学系, 山西运城, 044000)

摘要:由尖孢镰孢菌黄瓜专化型引起的黄瓜枯萎病是世界黄瓜生产上的一种毁灭性病害。本研究鉴定了尖孢镰孢菌黄瓜专化型丝绒蛋白的一个同源基因 *FocVel2*, 利用基因敲除和互补的方法研究该基因的功能。敲除突变体菌株 $\Delta FocVel2$ 出现明显的表型变化, 包括菌落生长速率降低和产孢量降低, 并且敲除突变株对黄瓜幼苗毒力明显减弱, 回补突变体菌株能够恢复敲除突变体 $\Delta FocVel2$ 的所有缺陷。总之, 研究结果发现丝绒蛋白基因 *FocVel2* 在菌体无性繁殖以及侵染过程中起到重要作用。

关键词: 黄瓜枯萎病; 丝绒蛋白; 基因敲除; 毒力

FocVel2 affects filamentous growth and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* FENG Bao-zhen, LI Pei-qian* (Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China)

Abstract: *Fusarium* wilt disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* is a devastating disease in cucumber cultivation worldwide. In this study, we identified a homologue of velvet gene *FocVel2* in *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. In order to determine the function of *FocVel2*, gene deletion and complementation experiments were performed. The mutant line $\Delta FocVel2$ showed obvious phenotypic defects, including the reduction of mycelium growth and conidial production. Moreover, the mutant strain $\Delta FocVel2$ showed reduced virulence in cucumber seedlings. The complementation strain was able to restore all the defects of $\Delta FocVel2$. In sum, our results indicated that *FocVel2* gene played an important role in the asexual process and pathogenicity.

Key words: Cucumber *Fusarium* wilt; velvet protein; gene deletion; virulence

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)06-0782-08

黄瓜枯萎病(*Fusarium* wilt disease)是黄瓜生产上的毁灭性病害之一,该病害由尖孢镰孢菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)引起,该病在世界范围内都有发生,造成黄瓜生产的严重损失^[1]。该病属于维管束病害,其主要症状表现为黄瓜叶片黄化、变褐、生长缓慢,最后整株死亡。据报道丝绒蛋白在丝状真菌中广泛存在,它们主要调节真菌有性和无性发育以及次级代谢过程^[2]。所有的丝绒蛋白基因都含有一个丝绒蛋白

结构域,与真菌的发育以及次级代谢过程相关^[3]。同型二聚体的 VELVET 复合物由 *VelA*、*VelB* 及 *LaeA* 组成,能够控制相关生化进程^[4]。比如在尼杜拉曲霉(*Aspergillus nidulans*)中,丝绒蛋白基因 *VosA* 和 *VelB* 通过形成异型或同型二聚体在多种细胞活化过程起到关键作用^[5]。最新研究发现,尼杜拉曲霉(*A. nidulans*) *VosA* 基因通过抑制锌指簇转录因子基因 *ScIB* 的表达来控制无性繁殖、活性氧压力反应以及次级代谢过程^[6]。

收稿日期: 2018-10-18; 修回日期: 2019-01-20; 网络出版时间: 2019-01-22

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190122.0919.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31501665); 运城学院应用研究项目(CY-2018016)

通讯作者: 李培谦, 副教授, 研究方向植物病害防治; E-mail: lipeiqianfly@126.com

第一作者: 冯宝珍, 副教授, 研究方向植物致病功能基因分析; E-mail: fengbaozhen@126.com。

丝状真菌中丝绒蛋白基因的功能已有相关报道,比如顶头孢霉 (*Acremonium chrysogenum*)^[7]、串珠镰刀菌 (*F. verticillioides*)^[8,9]、禾生球腔菌 (*Mycosphaerella graminicola*)^[10]、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)^[11]、*F. fujikuroi*^[12]、*Cochliobolus heterostrophus*^[13,14]、灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)^[15-17] 以及禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)^[18]。在这些病原菌中 *VeA* 基因与气生菌丝生长、分生孢子萌发以及生物膜的形成有关。将灰霉菌内的 2 个 *VeA* 同源基因 *Bcvel1* 和 *Bclae1* 敲除导致菌株不能形成菌核以及毒力下降^[15-17]。而将灰霉菌丝绒蛋白复合体 4 个基因 (*Bclae1*、*Bclve1*、*Bclve2*、*Bclve3*) 分别进行敲除研究,发现各突变菌株不仅表型不同,而且在体外接种离体番茄叶片及苹果时表现出了毒力差异。*Bclve3* 突变体的表型和毒力均与野生型菌株类似,而其它 3 个基因的敲除突变体菌落生长缓慢,而且毒力明显减弱^[19]。说明这些基因虽然参与寄主病原互作过程,但各基因功能存在差异。我们已对尖孢镰孢菌黄瓜专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 中丝绒蛋白基因 *FocVel1* 的功能做过报道,敲除 *FocVel1* 基因会导致菌株表型缺陷,不能形成完整生物膜以及毒力的减弱^[20]。然而对于尖孢镰孢菌中其他的丝绒蛋白基因功能未见报道。

本研究中,我们鉴定了源于尖孢镰孢菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 的一个新基因 *FocVel2*,并且明确该基因参与调控菌体菌丝生长及致病性等方面,为解析尖孢镰孢菌致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体与酶 本实验所用的野生型尖孢镰孢菌菌株 Foc-GD (CCTCCAF2013029) 的分离及保存方法参见^[20]。用于遗传转化的载体 PCH-sGFP,其相关图谱信息^[20]。DH-5 α 感受态细胞、质粒小提试剂盒以及胶回收试剂盒均购于天根公司。Southern 杂交所用的地高辛标记试剂盒购于 Roche 公司。真菌基因组提取试剂盒、构建载体所用的内切酶、连接酶均购于 TaKaRa 公司。其它常规试剂均为国产试剂。

1.1.2 培养基及试剂 (1) PDA 培养基: 马铃薯

200 g,葡萄糖 15 g,固体培养基加入琼脂 15 g,自来水 1000 mL。(2) STC 溶液: 山梨醇 145.75 g·L⁻¹, CaCl₂ 7.35 g·L⁻¹, Tris-HCl 7.88 g·L⁻¹。(3) PEG: PEG-4000 600 g·L⁻¹, MOPS 125.58 g·L⁻¹。(4) TEC: Tris-HCl 1.576 g·L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 5.88 g·L⁻¹, EDTA 0.29 g·L⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 *FocVel2* 基因克隆鉴定 从 Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>) 下载 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 基因组序列,查找 *VeA* 基因同源序列 (FOXG_00016),并设计引物(表 1),利用同源克隆法以菌株 Foc-GD 基因组 DNA 为模板进行扩增。PCR 扩增程序如下:上下游引物为 FocVel2-F 和 FocVel2-R, 94℃ 变性 4 min; 94℃ 1 min, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环;最后总延伸 72℃ 10 min。扩增产物回收转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH-5 α ,筛选阳性转化子送到上海博尚公司进行测序。测序结果经过 NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析鉴定。

1.2.2 *FocVel2* 基因在菌体中的表达分析 接种黄瓜枯萎病菌株 Foc-GD 分生孢子 10⁵ cfu 于液体马铃薯培养基 (PDB), 150 r·min⁻¹、28℃ 摇瓶培养,分别在 24、36、60 以及 72 h 收集菌丝。然后液氮研磨,提取总 RNA 并用反转录试剂盒制备 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。选取 EF-1 α 作为内参基因^[18],分析 *FocVel2* 基因在菌丝生长过程中表达水平,其中 *FocVel2* 基因引物为 16g-F2 和 16g-R2, EF-1 α 扩增引物为 EF-F 和 EF-R,引物序列见表 1。以尖孢镰孢菌延长因子 (*EF-1 α*) 为内参基因,通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量的方法^[21],分析 *FocVel2* 的表达水平。

1.2.3 *FocVel2* 基因重组片段扩增及转化子筛选 设计引物 (引物分别为 16up1 和 16up2, 16dn1 和 16dn2) 分别扩增 *FocVel2* 基因的上下游片段获得重组片段,然后与敲除载体质粒 pKOV21 连接,构建重组质粒;随后进行黄瓜枯萎病野生型 Foc-GD 原生质体转化,并用潮霉素 (*HPH*) 抗性进行初步筛选;再提取初步筛选的转化子 DNA,利用 *FocVel2* 基因引物进行 PCR (引物为 FocVel2-F 和 FocVel2-R) 验证、RT-PCR (引物为 Vel2-RTF 和 Vel2-RTR) 验证以及 Southern blot 验证,引物序列

见表 1。原生质体制备及 Southern blot 的具体试验方法参照文献描述步骤^[22]。设计探针引物 16-UP-pbF 和 16-UP-pbR(见表 1),通过 PCR 扩增探针,产物回收后于沸水中变性 10 min 后置于冰浴 2 min,然后加入标记混合物 37℃处理 20 min,进行 DIG-DNA 探针标记,然后置于-20℃保存备用。利用 *Xho* I 分别将野生型菌株 Foc-GD、敲除突变体菌株 $\Delta FocVel2$ 以及回补菌株 $\Delta FocVel2-C$ 基因组 DNA 进行酶切、电泳、变性,经过转膜再与探针进行杂交、显色、拍照。

1.2.4 *FocVel2* 基因敲除突变体回补实验 根据 *FocVel2* 基因序列,扩增包含启动子和终止子的全长序列,酶切后与回补载体质粒 pKN 连接,构建回补载体 pKN-*FocVel2-C*。再将回补质粒转化到 *FocVel2* 敲除突变体原生质体内,利用遗传霉素(G418)抗性进行初步筛选,观察表型是否能够恢复(表 1)。

1.2.5 黄瓜枯萎病菌株突变体表型分析 菌落生长速率测定:将活化 3 d 的野生型菌株、突变体菌株和回补菌株用 5 mm 打孔器打孔,将菌饼接种至 PDA 固体培养基中央,倒置培养皿于 28℃恒温培养箱中培养 5 d,测量菌落直径并拍照。产孢量测定:将活化 3 d 的野生型菌株、突变体菌株和回补菌株用 5 mm 打孔器打孔,取 5 块菌饼接种至 PDB 液体培养基中,于 28℃、150 r·min⁻¹培养 5 d,然后用三层灭菌纱布过滤,滤液用血球计数板计数。分生孢子萌发率测定:将上述孢子悬浮液置于 28℃培养箱内培养 2 h,取 10 μ L 于显微镜下观察。每个处理 5 个重复,实验重复 3 次。

1.2.6 黄瓜枯萎病菌株突变体致病性测定 将野生型菌株、突变体菌株和回补菌株活化后,按上述方法制备其孢子悬浮液。接种感病黄瓜品种‘9930’的幼苗。接种时,将孢子悬浮液加入水培黄瓜苗培养瓶中,终浓度调节为 10⁵ cfu,具体接种方法参见^[20]。接种后黄瓜幼苗置于 28℃、16/8 h 光暗交替培养。接种后每天观察黄瓜苗的变化并记录发病情况,发病等级分为 5 个等级:0—健康无病植株,1—子叶轻度萎蔫,2—子叶黄化,3—植株黄化萎蔫,4—植株死亡。植株病情指数=[\sum (各

级病株数×相应级数)/调查总株数×4]×100,参见^[20]。每个处理 15 棵幼苗,实验重复 3 次。

Table 1 Primers used in the study

Primers	Sequence (5'-3')
FocVel2-F	TTACTCGGATGGCAGTGGTT
FocVel2-R	TCTTCATCACCTTCGCCCTT
Vel2-RTF	CGACATAGCGGTTACAGTGC
Vel2-RTR	TGTCCTTCAGTGTCTCGAG
16up1	GCTCTAGAATGACCCAGTCCTTGTCGAG
16up2	GGACTAGTTGGTGCATATGGTGGGAGTT
16dn1	ACGCGTCGACAAGGGCGAAGGTGATGAAGA
16dn2	CCGCTCGAGTGCCCCGTAGCCATAAATTG
16g-F2	TGGTCGAAACAGGAGGAACA
16g-R2	ACGTGGAAACTCTCGCTGTA
EF-F	CGCTCTTCTGCCTACACCC
EF-R	ATCTCACGCTCCCAACCTT
16-UP-pbF	GCGTTCGTTTCATATGCACCT
16-UP-pbR	TGGTGCATATGGTGGGAGTT

2 结果与分析

2.1 *FocVel2* 基因克隆鉴定

经测序分析,*FocVel2* 基因序列(Genbank No: KR135840)全长 1 367 bp,有 5 个内含子。在 NCBI 网站 BLAST 分析发现其与来自 *F. fujikuroi* 的 *Velvet 2* (Genbank No: FN675836)相似性高达 93%。将 *FocVel2* 序列与 GenBank 已有部分 *VelB* 序列进行比对分析(图 1),发现它们具有明显的保守区域,说明 *FocVel2* 属于 *VelB* 同源基因。

2.2 *FocVel2* 基因在菌丝发育过程中表达水平分析

利用 qRT-PCR 技术对 *FocVel2* 基因在黄瓜枯萎病菌株 Foc-GD 菌丝发育过程中表达水平进行了测定,结果如图 2 所示。*FocVel2* 在菌丝发育初期(24、36 h)表达水平较低,而在 48 h 时相对表达量骤然升到峰值,随后的 60 及 72 h 表达量稍有下降,但仍然维持在较高水平。这说明 *FocVel2* 参与调控菌丝发育过程。

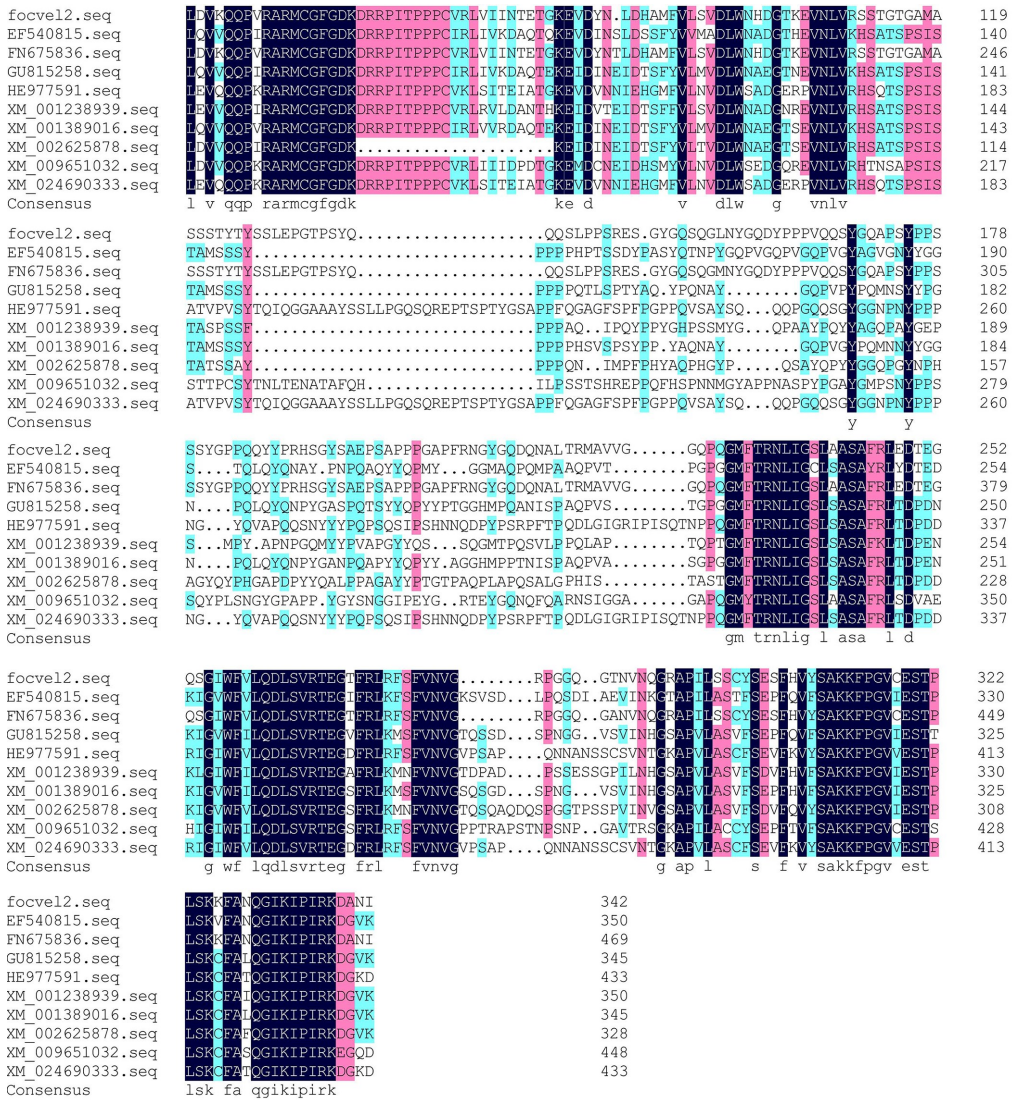


Fig. 1 Sequence alignment of *FocVel2* with other *VeIB* homologous sequences

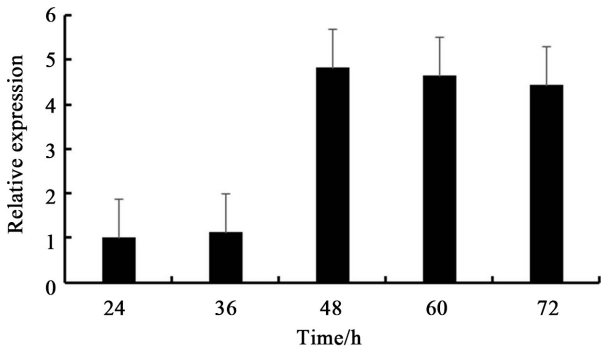


Fig. 2 Relative expression levels of the *FocVel2* in the *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* wide-type strain Foc-GD at different stages

2.3 *FocVel2* 基因敲除转化子和回补菌株的筛选验证

利用同源重组技术,将潮霉素基因替换 *FocVel2* 基因(图 3-A 为基因敲除策略)。将构建的重组质粒转化原生质体得到转化子。利用 PCR 及 Southern Blot 技术筛选验证所得转化子。图 3-C 为 RT-PCR 与 PCR 验证转化子的结果,可以看出 $\Delta FocVel2$ 菌株内检测不到 *FocVel2*;而回补菌株 $\Delta FocVel2$ -C 能够检测到表达,目的条带大小都与野生型菌株一致。

设计探针引物 16-UP-pbF 和 16-UP-pbR(见表 1),通过 PCR 扩增探针,产物回收变性后进行

DIG-DNA 探针标记,然后置于 -20°C 保存备用。利用 *Xho* I 分别将野生型菌株 *Foc*-GD、敲除突变体菌株 $\Delta FocVel2$ 以及回补菌株 $\Delta FocVel2$ -C 基因组 DNA 进行酶切、电泳、变性,经过转膜再与探针进行杂交,显色。结果如图 3-B 所示,进一步验证了敲除突变体菌株 $\Delta FocVel2$ 以及回补菌株 $\Delta FocVel2$ -C 的正确性。

2.4 *FocVel2* 基因缺失对表型的影响

相同培养条件下,敲除突变体菌株 $\Delta FocVel2$ 菌落生长缓慢,其菌落生长速率明显滞后于野生型及回补菌株(图 4-A)。显微镜下观察菌丝发现突变体在 $\Delta FocVel2$ 在 72 h 时气生菌丝相比野生型菌株变得致密且分枝增多(图 4-B)。结果表明,缺失 *FocVel2* 基因严重影响菌丝的正常生长速率,但并未影响菌丝的形态。

将野生型菌株、突变体菌株及回补菌株摇瓶培养 5 d,再进行产孢量比较。结果发现突变体菌株产孢量高于野生型菌株及回补菌株(图 5),说明 *FocVel2* 基因可能参与孢子发育过程,但是否影响分生孢子形态变化还需要进一步分析。

2.5 *FocVel2* 基因缺失对致病性的影响

将分生孢子悬浮液接种感病黄瓜‘9930’幼苗,在接种后一周内,野生型菌株 *Foc*-GD 接种的黄瓜幼苗逐渐出现症状,表型为叶片黄化(图 6),并且随着时间推移,叶片黄化越来越严重,最后整株枯死。敲除突变体 $\Delta FocVel2$ 接种的幼苗发病率明显降低,只有部分叶片出现黄化。结果表明 *FocVel2* 基因参与黄瓜枯萎病菌致病过程,缺失该基因致使菌株的毒力减弱。

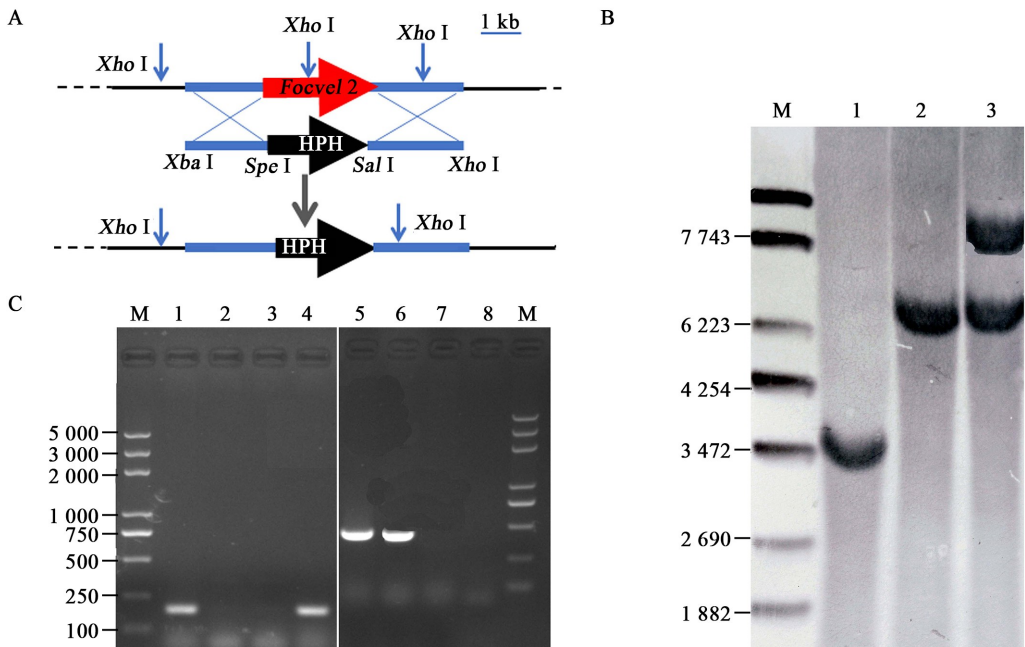


Fig. 3 Schematic representation of the *FocVel2* deletion strategy

A: *FocVel2* and hygromycin-resistance (*hph*) cassettes are denoted by large red and black arrows, respectively. Blue arrows represent the restriction enzyme sites of *Xho* I. B: Southern blot analysis. M, λ -EcoT14 I digest; lane 1, the wild-type strain (*Foc*-GD); lane 2, the *FocVel2* deletion mutant ($\Delta FocVel2$); lane 3, the complement strain ($\Delta FocVel2$ -C). C: RT-PCR and PCR analysis. M, Trans2K Plus DNA marker; lane 1-4: RT-PCR detection results, 1: the wild-type strain (*Foc*-GD), 2-3: the *FocVel2* deletion mutant ($\Delta FocVel2$), 4: the complement strain ($\Delta FocVel2$ -C); 5-8: PCR detection results, 5: the wild-type strain (*Foc*-GD), 6: the complement strain ($\Delta FocVel2$ -C), 7-8: the *FocVel2* deletion mutant ($\Delta FocVel2$).

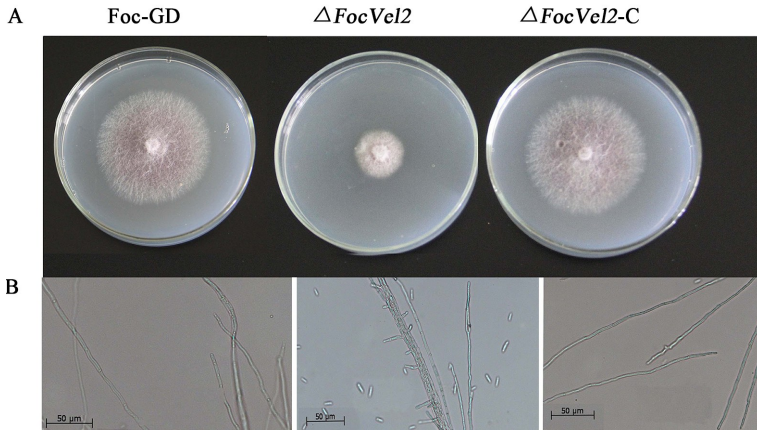


Fig. 4 Effects of the deletion of *FocVel2* on morphology

A: The wild-type strain (*Foc-GD*), *FocVel2* deletion mutant ($\Delta FocVel2$), and complemented strain ($\Delta FocVel2-C$) were grown on PDA media for 7 days at 26°C; B: Hyphal morphology and branching patterns of *Foc-GD*, $\Delta FocVel2$, and $\Delta FocVel2-C$ were observed with an optical microscopy. Bar = 50 μm .

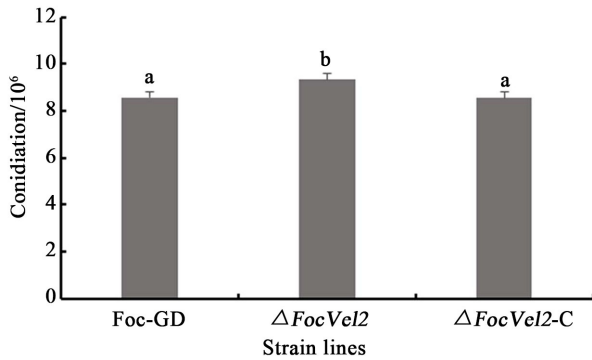


Fig. 5 Conidiation comparison for different stains

After incubation in 70 mL of PDB medium for 5 days in a shaker, conidia of the wild-type strain (*Foc-GD*), *FocVel2* deletion mutant ($\Delta FocVel2$), and complemented strain ($\Delta FocVel2-C$) were tested.

3 讨论

利用同源克隆法获得了黄瓜枯萎病 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 基因组中的基因 *FocVel2*, BLAST 分析发现该基因与 *F. fujikuroi* 的 *VeB* 基因相似度达 93%, 说明该基因属于 *VeB* 同源基因。丝绒蛋白复合体包括 *VeA*、*VeB*、*VeC* 和 *VosA* 四个调控蛋白, 在丝状真菌的生长发育、菌落形态及次级代谢方面起到重要的调控作用^[6]。本研究, 基因 *FocVel2* 缺失影响了黄瓜枯萎菌株多种表型缺

陷, 也造成了毒力减弱, 说明 *FocVel2* 参与黄瓜枯萎病菌多个细胞过程, 可能参与病原-寄主互作过程。

本研究中, *FocVel2* 缺失影响了黄瓜枯萎菌株多种表型缺陷, 包括生长速率减慢、孢子产量增多等。此类现象在前人研究中也有相似情况, 但存在不同之处。敲除黄瓜枯萎病菌 *VeA* 造成菌落生长速率缓慢^[20], 这与本研究结果一致。这说明 *FocVel2* 基因在黄瓜枯萎病菌菌丝生长过程中起到重要作用, 缺失 *FocVel2* 基因导致丝绒蛋白复合体蛋白之间互作功能失调, 导致后续的信号传导过程受阻从而抑制了相关结构基因转录水平下降^[16]。然而, 本研究中敲除突变体出现了产孢量增加的现象, 在构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 中, 敲除 *VeA* 基因也导致分生孢子产量增加现象^[4, 23]; 但是在产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、烟曲霉 (*A. fumigatus*)、轮枝镰刀菌 (*F. verticillioides*) 和水稻恶苗病菌 (*F. fujikuroi*) 的 *VeA* 基因敲除却导致分生孢子量下降^[8, 11, 12, 24]; 而将灰霉菌 (*B. cinerea*) *bcvel1* 基因敲除或者过表达, 获得的两种突变体表型缺陷基本一致^[19]。这进一步说明, *VelB* 作为丝绒蛋白复合体的重要成员, 通过与其它成员 *VeA*、*LAE* 等协调作用共同调节结构基因的转录表达, 任何一个成员缺失或者过表达都会影响丝绒蛋白复合体的稳定性从而影响下游信号传导过程^[6]。

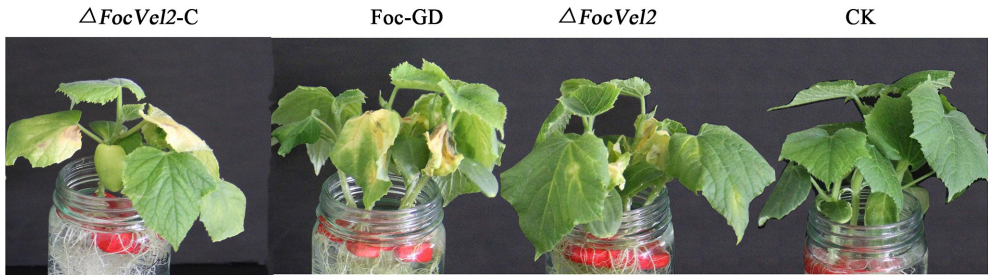


Fig. 6 Effects of the deletion of *FocVel2* on pathogenicity

Cucumber seedlings were inoculated with 1×10^6 conidia \cdot mL⁻¹ from $\Delta FocVel2$ -C, Foc-GD and $\Delta Focvel2$, ddH₂O treatment as control.

同时致病性测定结果表明,缺失 *FocVel2* 基因黄枯萎病菌株毒力下将,这与菌丝生长速率降低以及孢子萌发率降低有直接关系。*FocVell* 基因缺失菌株体外接种黄瓜幼苗,只有少量叶片枯萎,且枯萎程度减弱^[20],本研究与其结果类似。*FocVell* 属于 *VeA* 基因,*FocVel2* 属于 *VeB* 基因,二者皆为同型二聚体 VELVET 复合物的的重要组成部分,说明这两个基因参与菌体发育过程,影响菌体毒力。灰霉菌 (*B. cinerea*) *BcVEL1* 基因缺失造成突变体接种法国豆叶片时,病斑只是局限在接种点位置,不能扩展^[19]。同样灰霉菌 (*B. cinerea*) *bcvell*、*bcvel2* 和 *bcvel3* 基因敲除突变体表现出了毒力差异,将这 3 个突变体的分生孢子接种番茄叶片时,除了 *bcvel3* 突变体与野生型病斑扩展情况类似外,*bcvell* 和 *bcvel2* 突变体接种后病斑扩展缓慢^[19]。这种情况跟侵入位点 pH 有很大关系,侵入位点较低的 pH 有利于活化真菌组织内降解酶类及毒力因子完成在寄主组织内定殖、扩展^[25,26]。这些都说明 VELVET 蛋白复合体通过参与调控有机酸的分泌及寄主组织酸化过程来控制致病性^[6,27]。本研究为开展镰刀菌 VELVET 蛋白复合体功能分析提供了重要的理论支持,对镰刀菌的致病机理研究开阔了新思路,为植物枯萎病防治奠定了理论基础。

参考文献

[1] Zhao S, Du C M, Tian C Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber Fusarium Wilt by *Streptomyces vikiensis* HD-087 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28 (9):

2919-2927.

- [2] Bayram Ö, Braus G H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the VELVET family of regulatory proteins [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(1):1-24.
- [3] Bayram Ö, Feussner K, Dumkow M, *et al.* Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development [J]. Fungal Genetic Biology, 2016, 87 (6):30-53.
- [4] Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, *et al.* VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism [J]. Science, 2008, 320(5882):1504-1506.
- [5] Ahmed Y L, Gerke J, Park H S, *et al.* The VELVET family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B [J]. PLoS Biology, 2013, 11(12):e1001750.
- [6] Thieme K G, Gerke J, Sasse C, *et al.* Velvet domain protein VosA represses the zinc cluster transcription factor ScfB regulatory network for *Aspergillus nidulans* asexual development, oxidative stress response and secondary metabolism [J]. PLoS Genetics, 2018, 14 (7):e1007511.
- [7] Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, *et al.* A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10):3412-3422.
- [8] Li S, Myung K, Guse D, *et al.* FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides* [J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(5):

- 1418-1432.
- [9] Myung K, Li S, Butchko R A E, *et al.* FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarinsin *Fusarium verticillioides* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(11): 5089-5094.
- [10] Choi Y E, Goodwin S B. MVE1, encoding the velvet gene product homolog in *mycosphaerell agraminicola*, is associated with aerial mycelium formation, melanin biosynthesis, hyphal swelling, and light signaling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3):942-953.
- [11] Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, *et al.* Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* [J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(8):1236-1250.
- [12] Wiemann P, Brown D W, Kleigrew K, *et al.* FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence [J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(4):972-994.
- [13] Wu D, Oide S, Zhang N, *et al.* ChLae1 and ChVel1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* [J]. PLoS Pathogen, 2012, 8(2):e1002542.
- [14] Bayram O, Braus G H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins [J]. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiology Review, 2015, 36(1):1-24.
- [15] Schumacher J, Pradier J M, Simon A, *et al.* Natural variation in the VELVET gene *bcvell* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea* [J]. PLoS ONE, 2012, 7(10):e47840.
- [16] Schumacher J, Simon A, Cohrs K C, *et al.* The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(6):659-674.
- [17] Yang Q, Chen Y, Ma Z. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 50(1):63-71.
- [18] Jiang J, Liu X, Yin Y, *et al.* Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum* [J]. PLoS ONE, 2011, 6(11):e28291.
- [19] Müller N, Leroch M, Schumacher J, *et al.* Investigations on velvet regulatory mutants confirm the role of host tissue acidification and secretion of proteins in the pathogenesis of *Botrytis cinerea* [J]. New Phytologist, 2018, 219(3):1062-1074.
- [20] Li P, Pu X, Feng B, *et al.* *FocVel1* influences asexual production, filamentous growth, biofilm formation, and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:312.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ Method [J]. Methods-A Companion To Methods in Enzymology, 2001, 25(4):402-408.
- [22] Li P Q. Studies on biofilm formation and relative gene functional analysis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (in Chinese) [D]. Nanning: Guangxi University (南宁:广西大学), 2015.
- [23] Kim H, Han K, Kim K, *et al.* The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 37(1):72-80.
- [24] Krappmann S, Bayram Ö, Braus G H. Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module [J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(7):1298-1307.
- [25] Prusky D, Alkan N, Mengiste T, *et al.* Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development [J]. Annual Review of Phytopathology, 2013, 51(51):155-176.
- [26] Xu L, Xiang M, White D, *et al.* pH Dependency of sclerotial development and pathogenicity revealed by using genetically defined oxalate-minus mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(8):2896-2909.
- [27] Jashni M K, Dols I H, Iida Y, *et al.* Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(9):996-1008.