

核盘菌热休克蛋白 *Hsp70* 基因的克隆及功能分析

吕蕊花¹, 杨大群¹, 杜雨彤¹, 冯昭¹, 吕瑞华¹, 李依民², 张岗^{2*}

1 陕西中医药大学 医学技术学院, 陕西 咸阳 712046

2 陕西中医药大学 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046

吕蕊花, 杨大群, 杜雨彤, 冯昭, 吕瑞华, 李依民, 张岗. 核盘菌热休克蛋白 *Hsp70* 基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3677-3688.

Lǚ Ruihua, YANG Daqun, DU Yutong, FENG Zhao, Lǚ Ruihua, LI Yimin, ZHANG Gang. Cloning and functional analysis of heat shock protein *Hsp70* from *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3677-3688.

摘要: 为明确核盘菌热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, *Hsp70*)基因在菌核形成过程中的功能及其与病菌致病力的关系, 本研究采用逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)方法克隆核盘菌 *Hsp70* 基因并进行序列分析, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法测定基因在病菌不同生长阶段、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)及低温和高温胁迫下的相对表达量; 对 *Hsp70* 蛋白进行耐热性检测; 通过农杆菌介导法构建 *Hsp70* 基因沉默转化菌株, 采用离体油菜叶片接种法进行致病力检测, 在含腐霉利和甲基托布津药物培养基中进行耐药性检测。结果表明, 核盘菌 *Hsp70* 基因全长 1 890 bp, 与叶杯菌属(*Ciborinia*)的 *Hsp70* 亲缘关系较高; *Hsp70* 在菌核中表达量最高, 为菌丝中的 30 倍以上, cAMP 胁迫显著诱导 *Hsp70* 的表达, 40 °C下, *Hsp70* 表达量呈先升后降再升高的趋势, 4 °C处理无显著影响; 高表达 *Hsp70* 的重组菌株耐热性显著增加; 核盘菌 *Hsp70* 沉默转化子不能形成菌核, 其致病力和耐药性均下降。本研究揭示了 *Hsp70* 在核盘菌菌核形成及对抗不良环境中发挥重要作用, 为下一步深入解析核盘菌 *Hsp70* 的生物学功能提供参考。

关键词: 核盘菌; 热休克蛋白; 表达分析; 基因沉默; 致病力

资助项目: 陕西省自然科学基金(2021JQ-725)

This work was supported by the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province (2021JQ-725).

*Corresponding author. E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

Received: 2023-11-03; Accepted: 2024-04-09; Published online: 2024-04-15

Cloning and functional analysis of heat shock protein *Hsp70* from *Sclerotinia sclerotiorum*

LÜ Ruihua¹, YANG Daqun¹, DU Yutong¹, FENG Zhao¹, LÜ Ruihua¹, LI Yimin², ZHANG Gang^{2*}

1 College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

2 Key Laboratory of "Qin Medicine" Research and Development of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China

Abstract: To clarify the roles of the heat shock protein gene *Hsp70* in the sclerotial formation and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*, we employed reverse transcription PCR (RT-PCR) to clone *Hsp70* from *S. sclerotiorum* and performed sequence analysis. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to determine the relative expression levels of *Hsp70* at different growth stages and under the stress induced by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and low and high temperatures. The thermal stability of *Hsp70* was measured. The *Agrobacterium*-mediated method was employed to construct the *Hsp70*-silenced strain. The pathogenicity and fungicide resistance of strains were tested by inoculation in detached rapeseed leaves and cultivation in the media containing procymidone and thiophanate-methyl, respectively. The results showed that the cloned *Hsp70* had a total length of 1 890 bp and close relationship with the *Hsp70* gene of *Ciborinia*. *Hsp70* showcased the highest expression level in sclerotia, which was more than 30 times higher than that in hyphae. The cAMP stress significantly induced the expression of *Hsp70*. The expression level of *Hsp70* showed an increasing-decreasing-increasing trend at 40 °C and no significant change at 4 °C. Recombinant strain with high expression of *Hsp70* showed good thermal stability. The *Hsp70*-silenced transformant did not form sclerotia, with decreased pathogenicity and fungicide resistance. This study reveals that *Hsp70* plays an important role in the sclerotial formation and stress resistance of *S. sclerotium*, providing reference for further in-depth research on the biological roles of *Hsp70* in *S. sclerotium*.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; heat shock protein; expression analysis; gene silencing; pathogenicity

核盘菌是一种世界范围的植物病原菌，可侵染 600 多种植物，被侵染的植物发病率一般为 30%左右，温带地区的发病率高达 80%–100%^[1]。菌核是菌丝经过复杂的生理生化而形成的坚硬结构，可帮助核盘菌度过不良环境，在病菌生活史中占据核心位置。

热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)是生物体在受到外界胁迫时产生的、能够维持细胞稳

态的一种分子伴侣，在保护生物体免受外界生物或非生物胁迫方面发挥重要作用。根据相对分子量可分为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 和小热休克蛋白(small heat shock protein, sHsp)等 6 个家族，Hsp100 大多具有 ATP 酶和分子伴侣活性^[2-3]，Hsp90 主要参与蛋白成熟和复杂超分子蛋白组装^[4]，Hsp70 和 sHsp 主要参与真菌的发育及应激条件下的耐受和耐药性^[5-6]，

Hsp60 则主要是线粒体伴侣^[7]。通常情况下,生物体受到外界胁迫时,*Hsp* 家族的应激反应程度是有差异的,因而可以被加以利用,例如过表达 *Hsp104* 可缓解酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)产生的乙醇应激而提高其产生海藻糖的含量^[8]。*Hsp* 还可作为新型抗真菌药物对抗药物耐药性,*Hsp*/组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)双抑制剂可用于治疗唑类耐药性来治疗念珠菌(*Candida albicans*)感染^[9],*Hsp70*、*Hsp40* 和 *Hsp12* 也可作为抗曲霉菌(*Aspergillus sp.*)的潜在靶点进行杀菌剂的开发^[10]。棉属(*Gossypium*)在受到病毒感染时,*GhHsp40s* 和 *GhHsp70s* 均上调,盐胁迫和干旱胁迫下大部分 *Hsp* 基因均上调表达^[11]。酵母 *Hsp70* 和 *Hsp90* 形成功能性复合物,作为这两个伴侣蛋白之间的桥梁^[12],*Hsp70* 可以与辅伴侣蛋白 Bim 形成二聚体使酵母免受热休克^[13]。拟轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides*)在低于最适生长温度、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)在高于最适生长温度的条件下培养,它们的 *Hsp70* 表达量均显著升高^[14]。双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)在热胁迫过程中可以通过启动不同的热激蛋白基因表达来抵御高温胁迫对菌丝造成的损伤^[15]。曾博^[16]采用同源重组法构建了 *Hsp33* 和 *Hsp40* 突变株研究 *Hsp* 对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的功能影响,发现 *Hsp33* 可调控菌株的噬铁素形成能力及对高温的抵制能力,*Hsp40* 能够影响菌株的运动性。国内外研究表明^[17-18],热休克蛋白的表达量在生物体对抗外界不良环境,特别是在帮助生物体免受高温损伤方面发挥重要作用,而在核盘菌中热休克蛋白的功能尚未见报道。

前期通过核盘菌菌丝和菌核比较转录组分析发现 *Hsp70* 在菌核形成过程中大量表达,可能参与菌核形成,但其具体功能尚不清楚。为

明确 *Hsp70* 在核盘菌生长发育、应对不良环境、蛋白特征、致病性及耐药性等方面发挥的作用,本研究以核盘菌能响应外界不良环境而形成菌核的这一特征为切入点,分析核盘菌 *Hsp70* 基因在不同生长阶段及胁迫下的表达特征,探究 *Hsp70* 蛋白特性,并通过基因沉默技术研究 *Hsp70* 在核盘菌发育过程中的功能。研究结果阐明了核盘菌 *Hsp70* 的生物学功能和蛋白特性,揭示 *Hsp70* 在核盘菌菌核形成及对抗不良环境中的作用,为以 *Hsp70* 作为靶点的新型核盘菌杀菌剂的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

核盘菌菌株(*Sclerotinia sclerotiorum* Ss10715, 中国典型培养物保藏中心菌种保藏号: CCTCC AF 2021085)保存于本实验室,所用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基购自上海博微生物科技有限公司。T 载体克隆所用载体 pMD19-T、RNA 提取、纯化试剂盒、反转录及定量所用试剂均购自 TaKaRa, PCR 所用试剂和基因克隆所用感受态细胞购自 TransGen Biotech。电泳和核盘菌遗传转化所用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司, pSilent-1 载体购自武汉森灵生物科技有限公司, ALG1 农杆菌感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

1.2 核盘菌 *Hsp70* 的克隆和表达分析

收集核盘菌在 PDA 上的 S1、S2、S3 和 S4 时期菌丝,以及核盘菌在 PDA+5 mmol/L 环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)上的 2 个时期的菌丝材料,提取总 RNA 反转录合成 cDNA,同源克隆法设计 PCR 引物 *Hsp70-F/Hsp70-R* (表 1),PCR 扩增的 *Hsp70* 全长进行 T 载体克隆后挑选阳性菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。设计 qRT-PCR 引物 *qHsp70-F/*

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction site	Size (bp)
<i>Hsp70</i> -F	ATGGCTCCAGCTATTGGTAT	—	20
<i>Hsp70</i> -R	GTCAACCTCTTCGATCTCAG	—	20
q <i>Hsp70</i> -F	CCCGTATCCCACGTATCCAA	—	20
q <i>Hsp70</i> -R	ACCAGAGAGAATGGCAGCTT	—	20
β - <i>tubin</i> -F	TTGGATTTGCTCCTTTGACCAG	—	22
β - <i>tubin</i> -R	AGCGGCCATCATGTTCTTAGG	—	21
si- <i>Hsp70</i> -LF	CCCTCGAGCCAGCTATTGGTATCGATTT	<i>Xho</i> I	28
si- <i>Hsp70</i> -LR	CCAAGCTTCCGTAAGCAATGGCAGCTGC	<i>Hind</i> III	28
si- <i>Hsp70</i> -RF	GGGGTACCCAGCTATTGGTATCGATTT	<i>Kpn</i> I	28
si- <i>Hsp70</i> -RR	GAAGATCTTTGACGTTGTGAATCGGTGA	<i>Bgl</i> II	28
<i>hyg</i> -F	ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC	—	26
<i>hyg</i> -R	CTATTCCTTTGCCCTCGACGAGT	—	24

q*Hsp70*-R (表 1) 进行扩增, 以 β -*tubin*-F/ β -*tubin*-R 为内参, 检测 *Hsp70* 基因在菌核形成不同阶段的表达量。

1.3 不同温度胁迫下核盘菌 *Hsp70* 表达分析

将核盘菌菌丝接种在 PDA 平板上进行活化培养, 将菌饼接种于覆盖玻璃膜的 PDA 平板上, 25 °C、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养, 当菌丝生长到 S1、S2、S3 和 S4 时期, 分别置于 4 °C 和 40 °C 环境中处理 24 h, 每个处理设 3 个重复, 使用 q*Hsp70*-F/q*Hsp70*-R 为引物进行 qRT-PCR 扩增(表 1), 检测 *Hsp70* 基因表达量。

1.4 核盘菌 *Hsp70* 进化分析

使用在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *Hsp70* 蛋白的基本理化性质。利用 MEGA 软件邻近法构建 *Hsp70* 蛋白分子系统发育树。

1.5 *Hsp70* 蛋白耐热性及纯度检测

为了检测 *Hsp70* 耐热性, 将 *Hsp70* 与原核表达载体 pET-28a(+) 相连, 测序正确的重组质粒重命名为 pET-28a(+)-*SsHsp70*, 将其转化入 BL21(DE3) 感受态细胞, 以空载为对照, 添加异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 后于 37 °C、220 r/min

诱导表达 6 h。参考 Hu 等^[19] 方法, 将诱导菌液混匀后吸取 200 μ L 进行分装, 分装的菌液经 50 °C 水浴不同时间(0、30、60、90 min), 然后吸取 2 μ L 处理后菌液在平板上点样, 37 °C 培养 16 h 后进行观察, 每个时间段设 3 个重复。采用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化 *Hsp70*, 根据 SDS-PAGE 检测结果收集含有最大目的蛋白量的洗脱液 10 mL 送至钟鼎生物技术有限公司进行纯度检测。

1.6 核盘菌 *Hsp70* 沉默菌株的遗传转化

在线预测 *Hsp70* 特异性序列, 根据 pSilent-1 载体上的酶切位点设计引物(表 1), 左(si-*Hsp70*-LF/si-*Hsp70*-LR)、右臂(si-*Hsp70*-RF/si-*Hsp70*-RR) 分别正、反向连接到载体沉默区段两侧, PCR 检测为阳性的菌落进行测序验证。获得的重组质粒 pSilent-1+*SsHsp70* 转化入 ALG1 农杆菌感受态细胞。参照江明^[20] 的方法进行遗传转化, 黑暗条件下将农杆菌感受态细胞和研磨后的菌丝碎片共培养 48 h 后将玻璃纸转移到含有潮霉素(30 μ g/mL)+头孢噻肟钠(300 μ g/mL) 的 PDA 培养基上, 置于 25 °C 培养至菌丝长出, 后转移到 PDA+潮霉素(30 μ g/mL) 培养基上连续筛选 3 代, 能够稳定生长的初步判定为沉默菌株。提取其

基因组作为模板扩增潮霉素基因(*hyg-F/hyg-R*)进一步验证,参考 1.2 中的方法进行 qRT-PCR 分析。

1.7 核盘菌 *Hsp70* 沉默菌株致病力及耐药性检测

为了测定 *Hsp70* 沉默菌株的致病力,将离体的油菜叶片进行消毒、无菌水冲洗,置于铺有滤纸的培养皿中,无菌解剖针刺破后接种菌饼,室温进行观察,每个菌株重复 5 次。采用腐霉利和甲基托布津进行耐药性检测,配制不同浓度的腐霉利(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL)和甲基托布津(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL)含药 PDA 平板,分别接种沉默菌株菌饼后置于室温进行观察、测定,以相同条件下接种野生型核盘菌的平板作为对照,计算各药剂处理对不同核盘菌菌丝生长的相对抑制率,每个浓度重复 3 次。

相对抑制率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组净菌落直径

1.8 数据分析

qRT-PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析,通过 SPSS 22 软件中的 Duncan's 多重比较法检验组间的显著性差异($P<0.05$),利用 GraphPad Prism 5 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 *Hsp70* 的克隆及基本理化性质分析

核盘菌 *Hsp70* 基因全长 1 890 bp,含一个开放阅读框(open reading frame, ORF),编码 629 个氨基酸,提交 NCBI 获得 GenBank 注册号 OR 148242。在线预测该蛋白质的分子量为 68.52 kDa,等电点为 5.06,无信号肽。序列分析表明,核盘菌 *Hsp70* 与叶杯菌属(*Ciborinia*)山茶花腐病菌(*Ciborinia camelliae*) *Hsp70* 亲缘关系最高,与核盘菌属(*Sclerotinia*)的北方贝核盘霉(*Sclerotinia borealis*) *Hsp70* 亲缘关系较近,与内生菌除瓶头霉属(*Phialocephala*)的 *Hsp70* 关系较远(图 1)。

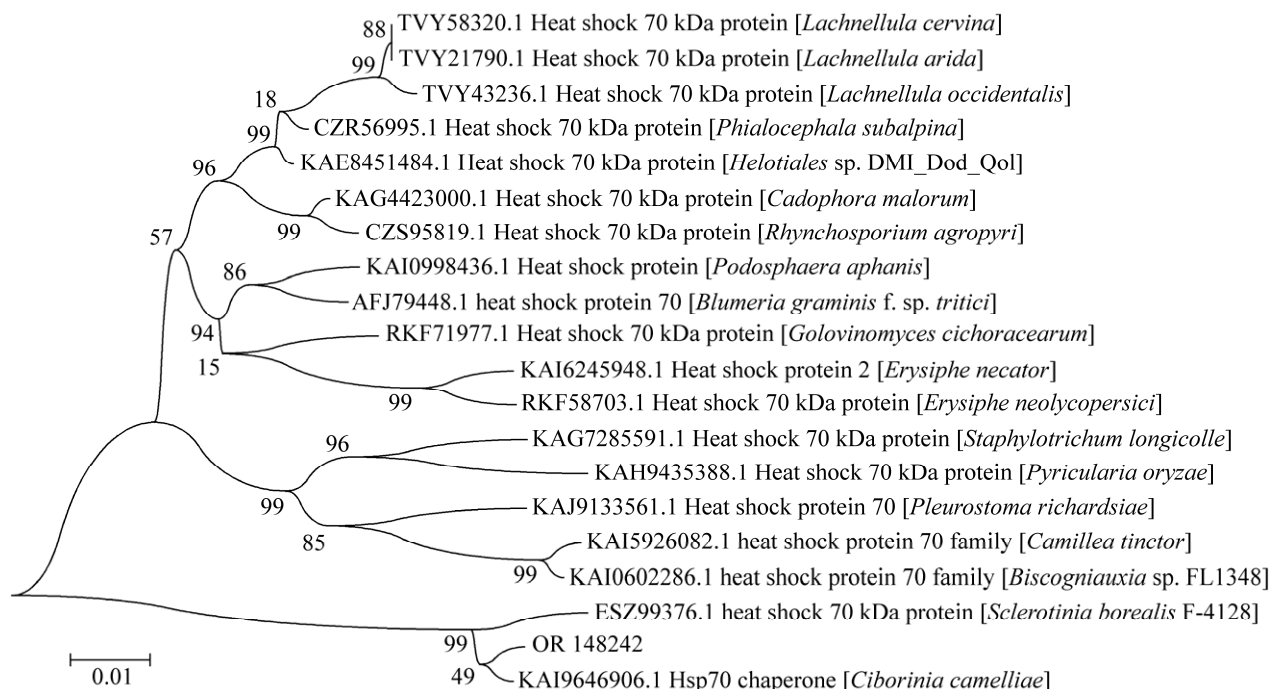


图 1 核盘菌 *Hsp70* 氨基酸序列系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of Hsp70 amino acid sequence of *Sclerotinia sclerotiorum*.

2.2 核盘菌 *Hsp70* 在不同生长时期及 cAMP 胁迫下的表达分析

分别以 S1、S2、S3、S4、M1 和 M2 时期处理的核盘菌作为材料, qRT-PCR 分析结果显示(图 2), *Hsp70* 在 S1-S3 阶段表达量均较低, 但在成熟菌核中的表达量明显增高, 是菌丝中的 30 倍。在受到外界 cAMP 胁迫时, *Hsp70* 在 M1 和 M2 时期的表达量明显高于 S1-S3 时期。

2.3 不同温度胁迫下核盘菌 *Hsp70* 表达分析

低温处理后, 核盘菌 *Hsp70* 基因在 S1-S4 阶段表达量相对稳定。40 °C 条件下, 核盘菌 *Hsp70* 基因相对表达量在 S2 时期先升高后 S3

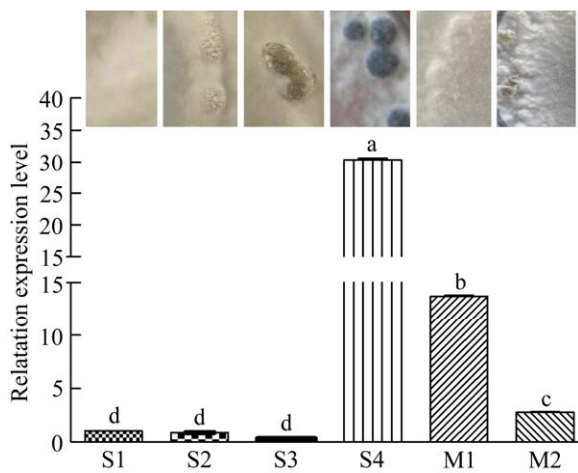


图 2 qRT-PCR 分析核盘菌 *Hsp70* 基因在不同生长阶段及培养条件下的表达量

Figure 2 Analysis of the expression level of *Hsp70* gene of *Sclerotinia sclerotiorum* at different growth stages and treatments using qRT-PCR. S1-S4 represent different stages of hyphae growing on PDA medium. S1: White hyphae; S2: Hyphal mass begins to exude liquid; S3: Melanin begins to form; S4: Mature sclerotia. M1 and M2: Different stages of *Sclerotinia sclerotiorum* on PDA+5 mmol/L cAMP plates. M1: Hyphae mass begins to exude liquid; M2: Melanin begins to form. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

时期又降低, 之后在 S4 时期又升高, 且在 S4 时期表达量达到峰值, 为 S1 时期的 7.2 倍(图 3), 表明核盘菌 *Hsp70* 基因的上调表达是其对高温胁迫的一种防御响应。

2.4 重组蛋白耐热性及纯度检测

由图 4 可知, 重组载体表达菌落在 0 min 和对照组无差别, 随着孵育时间的延长, 两组的菌落数目均逐渐减少。当孵育时间为 90 min 时, 对照组几乎不能长出菌落, 而在孵育相同时间后的实验组菌落数目明显多于对照组。由此表明, *Hsp70* 在对抗高温中发挥重要作用。收集 250 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱下来的蛋白(浓度为 1.3 mg/mL), HPLC 检测表明目的蛋白纯度为 56%。

2.5 核盘菌 *Hsp70* 沉默菌株的鉴定及生长情况

将能够在 PDA+潮霉素(30 mg/mL)平板上正常生长 3 代的菌株初步认定为对潮霉素抗性稳定的转化子, 提取其基因组 DNA, PCR 扩增潮霉素基因结果显示(图 5A), 与对照相比 5 个

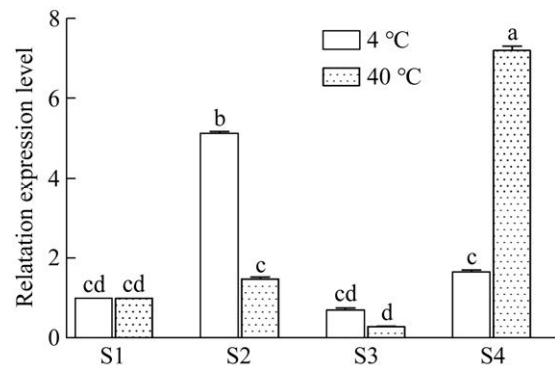


图 3 核盘菌经不同温度处理后 *Hsp70* 基因在不同生长阶段中的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of *Hsp70* gene in different growth stages of *Sclerotinia sclerotiorum* after different temperature treatments. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

沉默菌株产生相应大小扩增条带, 可以初步确定重组质粒已经转入核盘菌细胞内。qRT-PCR 分析结果显示, 5 个转化菌株的 *Hsp70* 基因均不同程度地被沉默且差异显著(图 5B)。以上结果说明通过构建重组 RNA 干扰载体, 采用农杆菌介导法将重组质粒导入核盘菌菌丝中, 成功

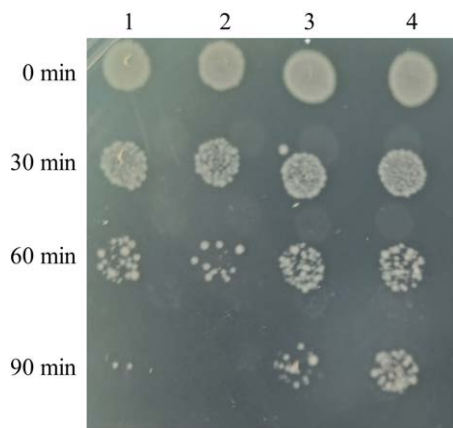


图 4 重组表达菌株经 50 °C 水浴处理不同时间的菌落图

Figure 4 Colony of recombinant expression strain treated with 50 °C water bath for different times. 1–2: pET-28a (+) empty vector transformed strain; 3–4: Recombinant vector transformation strain.

降低了核盘菌中 *Hsp70* 基因的表达量。

沉默转化子在菌丝颜色和菌核形成方面相较于对照组有比较显著的变化, 具体表现为沉默菌株菌丝颜色明显发黄, 生长 5 d 时, H4、H7 和 H9 菌落边缘的菌丝颜色较浅。生长 10 d 时, H7 和 H9 菌株在菌落边缘虽有菌丝聚集现象, 但均未见菌丝相互缠绕产生菌核(图 6)。

2.6 核盘菌 *Hsp70* 沉默菌株的致病力及耐药性

由图 7A 可以看出, 核盘菌菌丝侵染离体油菜叶片 48 h, 接种野生型菌丝的油菜叶片明显出现病斑, 病斑直径为 1.4 cm, 随着侵染时间的增长离体油菜叶片被侵染的面积逐渐增大。侵染 96 h 时, 野生型(wild type, WT)菌丝侵染油菜叶片造成的损伤面积最大, H2 菌株侵染叶片产生的损伤面积次之, 病斑直径为 3 cm, 而其他沉默菌株对油菜叶片未造成明显病斑, 表明核盘菌 *Hsp70* 基因可能与其致病力相关。不同浓度的腐霉利和甲基托布津对于转化子均有抑制作用, 随着浓度的提高抑制率逐渐增高(图 7B、7C), 说明转化子的耐药性降低。

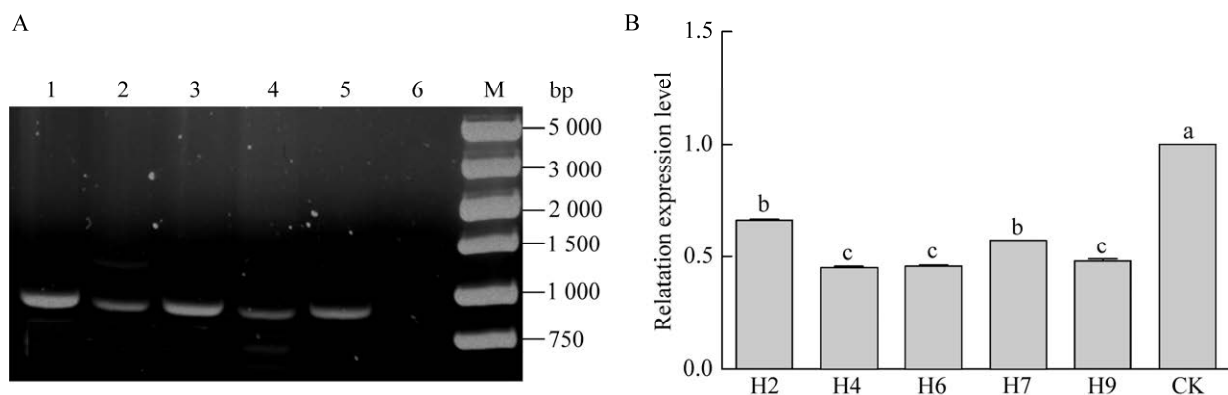


图 5 转化菌株相关基因表达量检测

Figure 5 Detection of related gene expression levels of transformed strains. A: PCR detection of transformed hygromycin genes (1–5: Silencing transformed H2, H4, H6, H7, H9; 6: CK; M: Marker); B: qRT-PCR detection of the expression level of *Hsp70* in transformants.

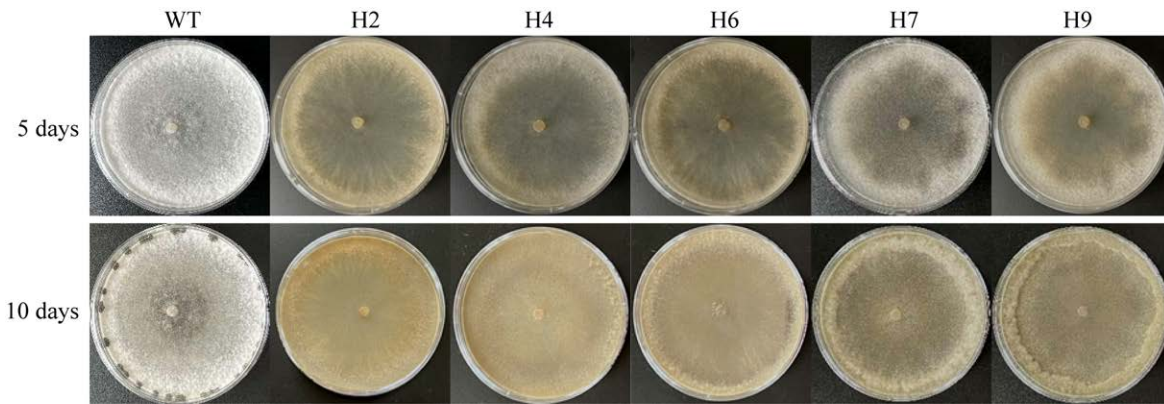


图 6 转化子在 PDA+潮霉素(30 mg/mL)培养基上不同时期的生长情况

Figure 6 Growth of transformants at different stages on PDA+hygromycin medium (30 mg/mL).

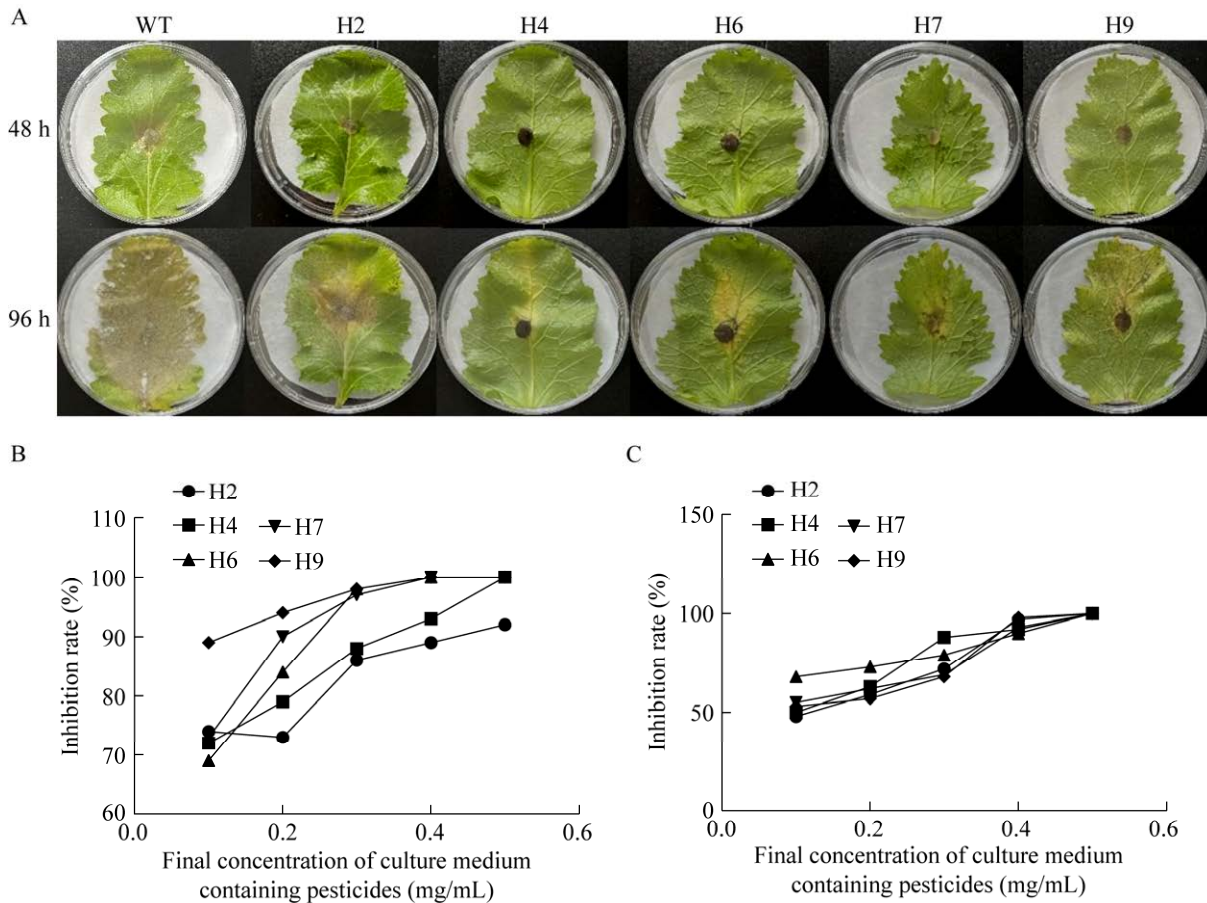


图 7 转化子致病力及耐药性检测

Figure 7 Detection of pathogenicity and resistance to pesticides in transformants. A: Mycelial infection of rapeseed leaves at different times. B: Inhibition effect of different concentrations of procymidone on transformants of *Sclerotinia sclerotiorum*. C: Inhibition effect of different concentrations of thiophanate-methyl on transformants of *Sclerotinia sclerotiorum*.

3 讨论

本研究通过前期转录组数据测序分析发现核盘菌 *Hsp70* 在菌丝和菌核中表达量差异较大,推测其在菌核形成中发挥重要作用。通过基因克隆获得核盘菌 *Hsp70* 基因全长 cDNA,序列比对显示 *Hsp70* 和来源于叶杯菌属(*Ciborinia*)的 *Hsp70* 亲缘关系较高,与来源于其他真菌的 *Hsp70* 同源性较低。qRT-PCR 结果显示 *Hsp70* 在菌核中表达量最高,为菌丝中的 30 倍以上,在受到外界 cAMP 胁迫时, *Hsp70* 的表达量也明显高于同时期对照组,来源于灵芝^[21]、水稻^[22]和林蛙^[23]的 Hsp 在受到外界生物或非生物胁迫时也表现出类似的表达模式。表明核盘菌在受到外界胁迫时可通过提高 *Hsp70* 的表达量来抵御不良环境。

核盘菌经 40 °C 处理, *Hsp70* 基因相对表达量在 S2 时期先升高后 S3 时期又降低,之后在 S4 时期又升高,且在 S4 时期表达量达到峰值,为 S1 菌丝时期的 7.2 倍,而经 4 °C 处理后 *Hsp70* 基因在 S1-S4 阶段表达量相对稳定。前期研究发现,核盘菌菌丝生长最适温度为 20-25 °C,当培养温度高于 40 °C 菌丝便停止生长^[24],但将菌核置于 50 °C 处理 300 d 仍具有活性,可萌发产生子囊盘^[25],暗示 *Hsp70* 主要在菌核形成初期和成熟的菌核中发挥作用,高温可诱导 *Hsp70* 的表达。类似的结果也在平菇^[26]和小麦条锈菌^[27]中已经报道。

苗兰天等^[28]使用 NTA 柱纯化目的蛋白后还用凝胶过滤层析法进行了二次纯化,得到的蛋白纯度为 99%。而本研究中的 *Hsp70* 蛋白经亲和层析纯化后所测得的蛋白纯度仅为 56%,这可能与洗脱目的蛋白前所选用的低浓度咪唑漂洗液(10 mmol/L 和 100 mmol/L)有关,使得洗

脱液里面还含有极性物质的非目的蛋白条带。为了进一步研究 *Hsp70* 的功能,将诱导表达的重组菌株和野生菌株进行 50 °C 高温处理不同时间以检测其耐热性,结果显示孵育相同时间的实验组菌落数目明显多于对照组,表明 *Hsp70* 的异源表达增强了大肠杆菌(*Escherichia coli*)的耐热性,这与茯苓(*Wolfi-poria cocos*) *WcHSP70-4*、*WcHSP90-1* 和 *WcHSP100-1* 异源表达的结果一致^[19]。Xu 等^[29]将海鲜菇(*Hypsizygus marmoreus*) *HmHsp70* 转化到烟草中,近 30% 的转基因烟草在高温(50 °C 和 52 °C 处理 4 h)下存活,而野生型烟草在两个温度下均未存活。这些结果说明,异源表达 *Hsp70* 可以提高宿主的耐热性,提示 *Hsp70* 在热胁迫方面的潜在应用价值。

敲除稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*) *Hsp40* 基因可导致菌丝生长、无性产孢、孢子萌发、子囊壳产生和附着胞形成等功能显著下降^[30],其热激蛋白复合物突变体菌丝生长速率、产孢量也显著减慢,致病力明显降低^[31],这些结果均表明热激蛋白参与稻瘟病菌菌丝生长和分生孢子的产生等过程。陈姗姗等^[32]采用 CRISPR/Cas9 技术获得大豆疫霉(*Phytophthora sojae*) *PsHSP70* 蛋白的纯合定点突变转化子,对其功能研究发现转化子的休止孢萌发率降低,卵孢子数量减少,同时致病性也减弱,推测该蛋白中 N-糖基化修饰结构可能影响大豆疫霉的生长发育和致病力。*F. graminearum* *HSP40* 敲除突变株和野生型菌株对戊唑醇的敏感性无显著差异,但敲除突变体菌株的分生孢子产孢量和对小麦穗的致病力显著降低^[33]。而白念珠菌(*Canidia albicans*) 小分子热休克蛋白 *Fmp28* 缺失,可通过调控 *Als3* 表达水平影响黏附过程和生物被膜形成从而提升毒力^[34],这也表明热休克蛋白在不同生物中对致病力的影响是有差异的。本研究结果发现

Hsp70 沉默转化子均不能形成菌核, 且致病力和耐药性均下降, 表明 *Hsp70* 与核盘菌菌核形成、致病力及耐药性均有关系, 但 *Hsp70* 在这 3 个方面的具体作用机制还需要进一步深入研究。

4 结论

本研究克隆核盘菌 *Hsp70* 基因全长, 通过异源表达发现 *Hsp70* 增强了 *E. coli* 的耐热性。*Hsp70* 在核盘菌菌核中表达量最高, 受到外界 cAMP 和高温胁迫时, *Hsp70* 的表达量在菌核形成过程中也明显升高。沉默核盘菌 *Hsp70* 基因证实了 *Hsp70* 在菌核形成、致病力以及耐药性方面均发挥重要作用。该研究结果为解析核盘菌菌核形成机制、适应外界不良环境以及该病害的防控提供了新的思路和方法。

REFERENCES

- [1] HOSSAIN MM, SULTANA F, LI WQ, TRAN LS P, MOSTOFA MG. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary: insights into the pathogenomic features of a global pathogen[J]. *Cells*, 2023, 12(7): 1063.
- [2] LEE S, ROH SH, LEE J, SUNG N, LIU J, TSAI FTF. Cryo-EM structures of the Hsp104 protein disaggregase captured in the ATP conformation[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(1): 29-36.
- [3] BÖSL B, GRIMMINGER V, WALTER S. The molecular chaperone Hsp104-a molecular machine for protein disaggregation[J]. *Journal of Structural Biology*, 2006, 156(1): 139-148.
- [4] JACKSON SE, QUEITSCH C, TOFT D. Hsp90: from structure to phenotype[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, 11(12): 1152-1155.
- [5] ROY A, TAMULI R. Heat shock proteins and the calcineurin-crz1 signaling regulate stress responses in fungi[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(5): 240.
- [6] SHAO WY, SUN KW, MA TL, JIANG HX, HAHN M, MA ZH, JIAO C, YIN YN. SUMOylation regulates low-temperature survival and oxidative DNA damage tolerance in *Botrytis cinerea*[J]. *New Phytologist*, 2023, 238(2): 817-834.
- [7] KAUFMAN BA, KOLESAR JE, PERLMAN PS, BUTOW RA. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Cell Biology*, 2003, 163(3): 457-461.
- [8] ZHANG YL, WANG WG, WEI WQ, XIA L, GAO S, ZENG WZ, LIU S, ZHOU JW. Regulation of ethanol assimilation for efficient accumulation of squalene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(16): 6389-6397.
- [9] LI CC, TU J, HAN GY, LIU N, SHENG CQ. Heat shock protein 90 (Hsp90)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for the treatment of azoles-resistant *Candida albicans*[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 227: 113961.
- [10] ANCUCEANU R, HOVANET MV, COJOCARU-TOMA M, ANGHEL AI, DINU M. Potential antifungal targets for *Aspergillus* sp. from the calcineurin and heat shock protein pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12543.
- [11] ZHOU X, SU L, TANG R, DONG YX, WANG F, LI R, XIE QL, ZHANG XL, XIAO GH, LI HB. Genome-wide analysis of *Hsp40* and *Hsp70* gene family in four cotton species provides insights into their involvement in response to *Verticillium dahliae* and abiotic stress[J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1120861.
- [12] DOYLE SM, HOSKINS JR, KRAVATS AN, HEFFNER AL, GARIKAPATI S, WICKNER S. Intermolecular interactions between Hsp90 and Hsp70[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(15): 2729-2746.
- [13] PAN H, SONG T, WANG ZQ, GUO YF, ZHANG H, JI T, CAO KK, ZHANG ZC. Ectopic BH3-only protein Bim acts as a cochaperone to positively regulate Hsp70 in yeast[J]. *Journal of Biochemistry*, 2021, 170(4): 539-545.
- [14] 陈悦, 李海笑, 刘峥, 刘宁, 孙蔓莉, 曹志艳, 董金皋. 拟轮枝镰孢和禾谷镰孢 *Hsp70* 基因家族鉴定及其在不同温度下的表达模式[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(12): 2407-2416.
- CHEN Y, LI HX, LIU Z, LIU N, SUN ML, CAO ZY, DONG JG. Identification of Hsp70 gene family in *Fusarium verticillioides* & *F. graminearum* and their expression patterns at different temperatures[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(12): 2407-2416 (in Chinese).

- [15] 郝海波, 黄建春, 王倩, 隗加香, 肖婷婷, 宋晓霞, 陈辉, 张津京. 热胁迫对双孢蘑菇抗氧化酶及热激蛋白基因的差异表达的影响[J]. 菌物学报, 2021, 40(3): 616-625.
HAO HB, HUANG JC, WANG Q, JUAN JX, XIAO TT, SONG XX, CHEN H, ZHANG JJ. Effects of heat stress on the differential expression of antioxidant enzymes and heat shock protein genes of *Agaricus bisporus*[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(3): 616-625 (in Chinese).
- [16] 曾博. 铜绿假单胞菌热休克蛋白基因 *dnaJ* 对毒力的调控研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2020.
ZENG B. Regulation of virulence by heat shock protein gene *dnaJ* in *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2020 (in Chinese).
- [17] LIU J, LIU Y, LI Q, LU Y. Heat shock protein 70 and Cathepsin B genes are involved in the thermal tolerance of *Aphis gossypii*[J]. *Pest Management Science*, 2023, 79(6): 2075-2086.
- [18] YU C, LEUNG SKP, ZHANG W, LAI LTF, CHAN YK, WOPNG MC, BENLEKBIR S, CUI Y, JIANG L, LAU WCY. Structural basis of substrate recognition and thermal protection by a small heat shock protein[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3007.
- [19] HU X, TANG X, ZHOU YM, AHMAD B, ZHANG DL, ZENG Y, WEI JY, DENG LL, CHEN SJ, PAN Y. Bioinformatics analysis, expression profiling, and functional characterization of heat shock proteins in *Wolfi-poria Cocos*[J]. *Bioengineering (basel)*, 2023, 10(3): 390.
- [20] 江明. 农杆菌介导核盘菌菌丝转化体系的建立及 *SsDRV* 下调基因 *Ss-CYP1* 的功能初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
JIANG M. Establishment of mycelium transformation system of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Agrobacterium tumefaciens* and preliminary study on the function of *Ss-CYP1* downregulated by mycovirus *SsDRV*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [21] CHEN C, LI Q, WANG QF, LU DH, ZHANG H, WANG J, FU RT. Transcriptional profiling provides new insights into the role of nitric oxide in enhancing *Ganoderma oregonense* resistance to heat stress[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15694.
- [22] 杜巧丽, 蒋君梅, 陈美晴, 宁娜, 任明见, 李向阳, 谢鑫. 水稻热休克蛋白 *HSP70* 基因克隆、表达分析及原核表达[J]. 植物保护学报, 2021, 48(3): 620-629.
DU QL, JIANG JM, CHEN MQ, NING N, REN MJ, LI XY, XIE X. Cloning, expression analysis and prokaryotic expression of heat shock protein *HSP70* gene in rice[J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48(3): 620-629 (in Chinese).
- [23] 刘婷婷, 郭晶晶, 陈兆东, 刘玉芬, 井乐刚, 刘鹏, 赵文阁. 黑龙江林蛙热休克蛋白 *hsp70* 家族基因的鉴定及其在感染下的表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1710-1730.
LIU TT, GUO JJ, CHEN ZD, LIU YF, JING LG, LIU P, ZHAO WG. Identification of heat shock protein *hsp70* family genes from *Rana amurensis* and its expression profiles upon infection[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(4): 1710-1730 (in Chinese).
- [24] 吕蕊花, 赵爱春, 余建, 王传宏, 刘长英, 蔡雨翔, 余茂德. 桑椹肥大性菌核病原菌生物学特性及流行性[J]. 微生物学报, 2017, 57(3): 388-398.
LÜ RH, ZHAO AC, YU J, WANG CH, LIU CY, CAI YX, YU MD. Biological and epidemiological characteristics of the pathogen of hypertrophy sorosis scleroteniosis, *Ciboria shiraiana*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 388-398 (in Chinese).
- [25] MICHAEL PJ, LUI KY, THOMSON LL, LAMICHHANE AR, BENNETT SJ. Impact of preconditioning temperature and duration period on carpogenic germination of diverse *Sclerotinia sclerotiorum* populations in southwestern Australia[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(6): 1798-1805.
- [26] ZOU YJ, ZHANG MJ, QU JB, ZHANG JX. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in mycelium of *Pleurotus ostreatus* in response to heat stress and subsequent recovery[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2368.
- [27] 曹华宁, 刘博, 刘太国, 高利, 陈万权. 小麦条锈菌 *hsp70* 基因的克隆及热胁迫下的表达特征分析[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 19-24.
CAO HN, LIU B, LIU TG, GAO L, CHEN WQ. Cloning of a heat shock protein gene *hsp70* of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and its expression in response to high-temperature stress[J]. *Plant Protection*, 2015, 41(3): 19-24 (in Chinese).
- [28] 苗兰天, 卢天华, 何晓亮, 周晓辉. 胡萝卜软腐果胶杆菌 CpxP 蛋白纯化及抑菌功能鉴定[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 847-856.
MIAO LT, LU TH, HE XL, ZHOU XH. Purification and bacteriostatic identification of CpxP protein from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*[J].

- Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(5): 847-856 (in Chinese).
- [29] XU LL, GAO J, GUO LZ, YU H. Heat shock protein 70 (HmHsp70) from *Hypsizygus marmoreus* confers thermotolerance to tobacco[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 12.
- [30] 童琪, 王春燕, 阙亚伟, 肖宇, 王政逸. 稻瘟病菌热激蛋白(HSP)40 编码基因 *MoMHF6* 的鉴定及功能研究[J]. 中国水稻科学, 2023, 6: 563-576.
- TONG Q, WANG CY, QUE YW, XIAO Y, WANG ZY. Identification and functional study of the heat shock (HSP) 40 encoding gene *MoMHF6* from *Magnaporthe grisea*[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2023, 6: 563-576 (in Chinese).
- [31] 杨杰. 稻瘟病菌热激蛋白复合体 MoSsb1-MoSsz1-MoZuo1 及 SNARE 蛋白 MoSec22 的相互作用蛋白在致病过程中的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2018.
- YANG J. Functional analysis of the interaction protein between heat shock protein complex MoSsb1-MoSsz1-MoZuo1 and SNARE protein MoSec22 of *Magnaporthe grisea* in the pathogenic process[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [32] 陈姗姗, 郑玉欣, 王玉珂, 马全贺, 张灿, 刘西莉. 大豆疫霉 PsHSP70 蛋白的 N-糖基化修饰对病原菌生长发育的影响, 2023 年学术年会论文集[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2023: 1.
- CHEN SS, ZHENG YX, WANG YK, MA QH, ZHANG C, LIU XL. The effect of N-glycosylation modification of PsHSP70 protein from *Phytophthora sojae* on the growth and development. Proceedings of the 2023 Academic Annual Conference[C]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2023: 1 (in Chinese).
- [33] 吕俊博, 赵彦翔, 黄金光. 禾谷镰孢菌热激蛋白 FGSG_05133 的功能研究, 2023 年学术年会论文集[C]. 中国农业科学技术出版社, 2023: 1.
- LÜ JB, ZHAO YX, HUANG JG. Functional study on heat shock protein FGSG_05133 of *Fusarium graminearum*. Proceedings of the 2023 Academic Annual Conference[C]. China Agricultural Science and Technology Press, 2023: 1 (in Chinese).
- [34] 谈军军. 白念珠菌小分子热休克蛋白 Fmp28 的致病功能及机制初探[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2023.
- TAN JJ. Function and mechanism of small heat shock protein Fmp28 on pathogenicity in *Candida albicans*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2023 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)