

研究报告

草菇热激蛋白 60 基因(*Vvhsp60*)生物信息学分析及低温下的表达

陈明杰^{#1}, 杨焕玲^{#1}, 余昌霞¹, 姜雅², 姜建新², 杨华平², 赵妍^{*1}

1 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403

2 江苏江南生物科技有限公司, 江苏 丹阳 212300

陈明杰, 杨焕玲, 余昌霞, 姜雅, 姜建新, 杨华平, 赵妍. 草菇热激蛋白 60 基因(*Vvhsp60*)生物信息学分析及低温下的表达[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1629-1637

Chen Mingjie, Yang Huanling, Yu Changxia, Jiang Ya, Jiang Jianxin, Yang Huaping, Zhao Yan. Bioinformatics analysis and relative expression of *Vvhsp60* gene in *Volvariella volvacea* under low temperature stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1629-1637

摘要:【背景】生物受到温度胁迫时, 热激蛋白被诱导并在短时间内大量产生, 可以使受损的蛋白质恢复正常构象, 增强生物对逆境胁迫的耐受性。【目的】初步探究草菇热激蛋白 60 (*Vvhsp60*)与低温耐受性的关系, 为深入开展草菇不耐低温特性的遗传改良奠定理论基础。【方法】对 *Vvhsp60* 进行生物信息学分析, 以低温敏感型草菇菌株 V23 及耐低温菌株 VH3 为实验材料, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析低温胁迫及热激诱导后在低温下草菇菌丝体中 *Vvhsp60* 基因的表达水平。【结果】草菇 *Vvhsp60* 编码蛋白不存在信号肽, 不属于分泌蛋白, 在线粒体和细胞质内发挥生物学作用, 属于双向跨膜蛋白。低温处理显著提高了 V23 与 VH3 菌丝体中 *Vvhsp60* 基因的表达量, 而且 VH3 中的表达量显著高于 V23, 推测 *Vvhsp60* 基因的表达量高可能有助于增强草菇对低温胁迫的耐受性。经热激处理后两菌株 *Vvhsp60* 基因的表达量显著高于各自未热激处理的对照组, 表明热激处理可诱导 *Vvhsp60* 基因的表达。【结论】*Vvhsp60* 与草菇低温耐受性相关, 并且热激可以诱导 *Vvhsp60* 基因的表达。

关键词: 草菇; 低温胁迫; 热激蛋白 60 基因(*Vvhsp60*); 实时荧光定量 PCR

基金项目: 上海市科技兴农项目(2020-02-08-00-12-F01479)

#对本文贡献相同

Supported by: Shanghai Science and Technology Agricultural Development Program (2020-02-08-00-12-F01479)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: jiandan289@126.com

Received: 2021-09-18; Accepted: 2021-11-29; Published online: 2022-01-19

Bioinformatics analysis and relative expression of *Vvhsp60* gene in *Volvariella volvacea* under low temperature stress

CHEN Mingjie^{#1}, YANG Huanling^{#1}, YU Changxia¹, JIANG Ya², JIANG Jianxin², YANG Huaping², ZHAO Yan^{*1}

1 Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

2 Jiangsu Jiangnan Biotechnology Company, Limited, Danyang 212300, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Facing temperature stress, organisms produce a large amount of heat shock protein in a short time, which can restore the conformations of damaged proteins and enhance the tolerance of organisms to stress. [Objective] To preliminarily explore the relationship between heat shock protein *Vvhsp60* and low temperature tolerance of *Volvariella volvacea*, and thereby lay a theoretical foundation for further genetic improvement of *V. volvacea* for low-temperature tolerance. [Methods] The bioinformation of *Vvhsp60* was analyzed. The expression of *Vvhsp60* gene in low temperature-sensitive strain V23 and low temperature-tolerant strain VH3 under low temperature stress and under heat shock-low temperature treatment was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). [Results] With no signal peptide, *Vvhsp60* is not a secretory protein. It exerts biological functions in mitochondria and cytoplasm and is a bidirectional transmembrane protein. Low temperature significantly increased the expression of *Vvhsp60* gene in mycelia of both V23 and VH3, and the expression in VH3 was significantly higher than that in V23, which suggests that the high expression of *Vvhsp60* gene may help enhance the low-temperature tolerance of VH3. After heat shock treatment, the expression of *Vvhsp60* gene in the two strains was significantly higher than that in those without heat shock treatment, indicating that heat shock can induce the expression of *Vvhsp60* gene. [Conclusion] *Vvhsp60* gene is related to the low-temperature tolerance of *V. volvacea*, and heat shock can induce the expression of *Vvhsp60* gene.

Keywords: *Volvariella volvacea*; low-temperature stress; *Vvhsp60* gene; real-time fluorescent quantitative PCR

草菇(*Volvariella volvacea*)在分类上属于伞菌纲伞菌目光柄菇科小包脚菇属^[1]。草菇属于高温型食用菌,菌丝及子实体最适宜生长温度为28–35 °C,在低温(4 °C)环境下会限制菌丝生长,并且子实体会出现组织变软、液化和腐烂等自溶现象,严重影响了草菇的生产与推广^[2–3],因此对草菇应答低温胁迫机制的研究及不耐低温特性的改良迫在眉睫。

热激蛋白(heat shock protein, HSP)主要负责细胞的完整性,通过分子伴侣的形式维持生物体内环境的稳定,在逆境调控过程中发挥重

要作用,是具有抗逆作用的保护蛋白^[4–6]。热激蛋白根据功能划分为分子伴侣(HSP70 和 HSP60)、具有催化活性的蛋白(泛素蛋白酶、HSP100 和酪氨酸磷酸酶)及功能未知的蛋白质(晶状体和分泌糖蛋白)等^[7]。HSP60 具有高度保守性,可以和多种蛋白质结合,防止在转录后与折叠前蛋白质的异常聚集^[8]。在真菌中,热激蛋白诱导有特异性机制和通用性机制,前者是温度胁迫,后者是其他胁迫,如 pH、氧化应激、渗透压、饥饿或抗真菌的压力^[9]。研究表明,真菌中 HSP 的诱导合成有助于提高其

耐温性。双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)在热胁迫过程中可以通过启动不同热激蛋白基因的表达来抵御高温胁迫对菌丝造成的损伤^[10];对真姬菇(*Hypsizygos marmoreus*)高温胁迫应答蛋白组学差异分析发现热激蛋白 HSP70 为上调蛋白,与高温胁迫密切相关^[11];香菇(*Lentinula edodes*)中热激蛋白及疏水蛋白对耐高温同样具有一定的作用^[12];草菇经热激处理后生长速度显著提高,菌丝体中 *hsp100* 和 *hsp90* 基因的表达量明显增加,增强了对低温胁迫的耐受性^[13-14];秦佳等^[15]将过表达的 *ClpB* (*hsp100*)转基因番茄与对照组进行低温处理后在正常温度下恢复生长,发现转基因的番茄在恢复培养期间表现出较强的耐冷性。

本研究在草菇全基因组测序的基础上,对热激蛋白 *Vvhsp60* 基因进行生物信息学分析,实验材料选取低温敏感型菌株 V23 及复合诱变育种获得的耐低温菌株 VH3,并利用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)检测低温胁迫及经热激诱导后在低温胁迫下草菇菌丝体中 *Vvhsp60* 基因表达量的变化,初步探究热激蛋白 *Vvhsp60* 与草菇耐低温性的关系,为深入开展其不耐低温特性的遗传改良奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

供试菌株为在上海市农业科学院食用菌研究所保藏的低温敏感型草菇菌株 V23 及对 V23 进行复合诱变获得的耐低温菌株 VH3。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

Redzol 试剂盒,北京赛百盛生物技术有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II

荧光定量试剂盒, TaKaRa 公司。

均质仪, Eppendorf 公司; 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基、马铃薯葡萄糖液体培养基, 碧迪医疗器械有限公司。

1.2 草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 生物信息学分析

1.2.1 草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 基因序列的获得

根据草菇表达谱中热激蛋白家族同源物种基因的登录号,在 NCBI 中查找获得其编码区序列,与草菇全基因组进行序列信息比对,在 GenBank 中 BLAST 比对 DNA 序列^[16],按照真核生物去除内含子的原则(GT-AG)去除可能的内含子,获得草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 基因的核苷酸编码区序列,编号为 VVO_10610。

1.2.2 基本理化性质分析

草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 的基本理化性质、信号肽、亚细胞定位、跨膜结构及蛋白磷酸化位点的预测分别使用 ExPASy ProtParam、SignalP 5.0、TargetP 1.1、TMpred Server 和 NetPhos 3.1 Server 在线分析^[17]。

1.2.3 系统发育树的构建

通过 ClustalX 同源比对后,使用软件 MEGA 6.0 (参数默认为 bootstrap values 1 000 replicates; neighbor-joining)构建系统发育树。

1.3 低温胁迫下草菇 *Vvhsp60* 基因的荧光定量分析

1.3.1 草菇菌丝体的处理和样品收集

将菌株 V23 和 VH3 接种到马铃薯葡萄糖琼脂培养基上,32 °C 黑暗培养 4 d,用均质仪打碎后接入含 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基的摇瓶中,32 °C、150 r/min 黑暗培养 6 d。将两株菌一部分直接冰浴(0 °C) 0 (对照组)、2、4、6、8、10 h;另一部分进行 40 °C 热激 2 h 处理后,再至冰浴(0 °C)中处理 0 (对照组)、2、4、6、8、10 h。在无菌条件下收集菌丝,具体操作参考文献[13],液氮速冻,-80 °C 保存备用。

1.3.2 草菇菌丝总 RNA 提取及反转录

参照 Redzol 试剂盒说明书提取草菇菌丝体的总 RNA, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。使用反转录试剂盒将草菇 RNA 反转录为 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 *Vvhsp60* 基因的实时荧光定量

在 *Vvhsp60* 基因的核苷酸编码区设计特异性引物, 内参基因选用微管蛋白(tubulin, *Tub*) 基因^[18], 由上海捷瑞生物工程有限公司合成正向反向引物(表 1)。根据目的基因和内参基因质粒标准曲线的扩增效率和扩增趋势线斜率确定荧光定量的方法, 使用 $\Delta\Delta C_T$ 法对 *Vvhsp60* 基因进行定量。实时荧光定量 PCR 的反应体系及反应条件参考文献[17], 每组处理设置 3 个生物学重复, 无菌水代替模板作为阴性对照, 定量结果由 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪自动生成, 其中待测样品的 C_T 值均在 10–30 之间, 平行样品之间的 C_T 差值均小于 0.5, 以保证定量的结果准确可信。

1.3.4 数据处理

每组处理和测定均为 3 个重复, 用 Excel 统计数据, 每组处理均以 V23 为对照, 用 SPSS V20.0 进行 Duncan 多重检验分析, $P>0.05$ 表示差异不显著, $P<0.05$ 表示差异显著, 并采用 Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 生物信息学分析

2.1.1 基本理化性质分析

使用 ProtParam 软件在线分析, 结果显示 *Vvhsp60* 有 563 个氨基酸, 分子量为 59.32 kDa,

等电点为 5.46; 不稳定系数为 29.44, 为稳定蛋白质; 总平均亲水性为 -0.071 , 表现为亲水性; 74 个带负电氨基酸(天冬氨酸+谷氨酸), 67 个带正电氨基酸(精氨酸+赖氨酸)。信号肽预测表明 *Vvhsp60* 不存在信号肽, 不属于分泌蛋白; 通过 TargetP 1.1 进行的亚细胞定位显示 *Vvhsp60* 位于线粒体上, 进一步访问 PSORTB 服务器, 从得出的结果可以看出, *Vvhsp60* 蛋白主要是在细胞质中发挥生物学作用, 综合分析表明草菇 *Vvhsp60* 编码蛋白在线粒体和细胞质内发挥生物学作用。跨膜结构预测(图 1)表明, *Vvhsp60* 蛋白存在由内向外和由外向内的跨膜结构, 而且预测分值均较高, 说明该蛋白属于双向跨膜蛋白。磷酸化位点分析(图 2)显示, 草菇 *Vvhsp60* 含有 24 个丝氨酸(Ser)、22 个苏氨酸(Thr)及 3 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。

2.1.2 系统发育树构建分析

草菇 *Vvhsp60* 蛋白质与多种真菌的 HSP60 具有很高的同源性, 将对比得到的氨基酸序列使用 MEGA 6.0 构建系统发育树, 结果如图 3 所示。草菇 *Vvhsp60* 与同样为草腐菌的双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 属于同一分支, 具有较高的同源性, 而小皮伞科(*Moniliophthora roreri*) MCA 2997 和脐菇属(*Gymnopus luxurians*) FD-317 M1 属于不同的大分支, 亲缘关系较远。

2.2 低温胁迫下草菇 *Vvhsp60* 基因的表达量变化

实时荧光定量 PCR 检测 VH3 和 V23 菌株 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 0、2、4、6、8、10 h 后 *Vvhsp60* 基因的相对表达水平, 结果如图 4 所示。在整个低温处理过程中, *Vvhsp60* 基因在两株菌中的

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>Vvhsp60</i>	GGAGTCGTCCTCATCG	CCCTTGCTGCGTCATAG
<i>tub</i>	CCAACACTACCGCTATCTCC	TTCACCTTCTCCATACCT

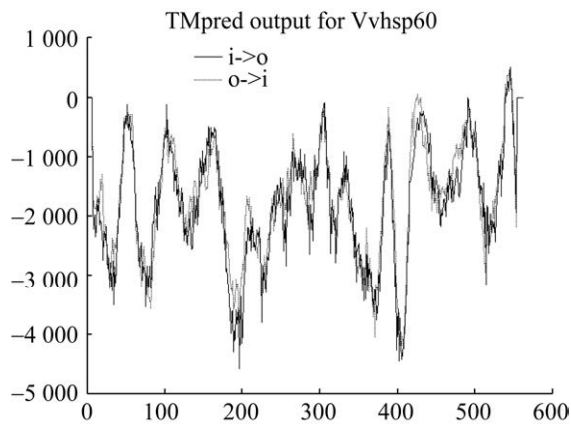


图 1 草菇 *Vvhsp60* 蛋白的跨膜结构域预测
i->o: 由内向外螺旋线; o->i: 由外向内螺旋线
Figure 1 Predicted transmembrane domains of *Vvhsp60* from *V. volvacea*. i->o: Inside to outside helices; o->i: Outside to inside helices.

表达趋势基本一致, 短时间低温刺激促使 *Vvhsp60* 基因表达量升高, 随着低温胁迫时间的延长 *Vvhsp60* 基因表达量逐渐降低, 但耐低温菌株 VH3 的 *Vvhsp60* 基因的表达水平要显著

高于低温敏感型菌株 V23。在受到低温胁迫时, 菌株 VH3 比 V23 的 *Vvhsp60* 基因转录能力更强, 推测合成 *Vvhsp60* 蛋白质与变性蛋白质结合的能力也更强, 表明 *Vvhsp60* 基因与草菇的耐冷性密切相关。

2.3 经热激处理后草菇 *Vvhsp60* 基因在低温胁迫下的表达量变化

菌株 V23 和 VH3 经热激处理后, 再在 0 °C 下胁迫 0、2、4、6、8、10 h 的 *Vvhsp60* 基因相对表达量如图 5 和图 6 所示。经 40 °C 热激 2 h 处理再进行低温胁迫, 两株菌的 *Vvhsp60* 基因相对表达量均显著高于单独的低温胁迫, 而且两株菌在低温胁迫过程中呈现的表达趋势基本一致, 说明热激处理没有改变 *Vvhsp60* 基因的表达模式, 只是诱导了 *Vvhsp60* 基因大量表达。该结果说明, 热激处理可以提高 *Vvhsp60* 基因的表达水平, 有效地增加草菇菌丝体中 *Vvhsp60* 基因的表达量, 有助于提高草菇对低温胁迫的耐受能力。

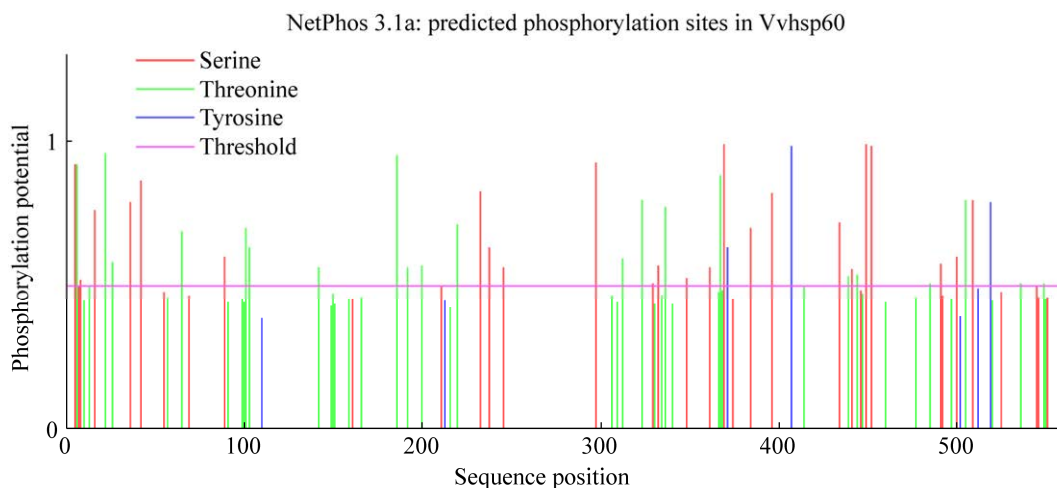


图 2 草菇 *Vvhsp60* 蛋白的磷酸化位点预测 红色线: 丝氨酸(serine); 绿色线: 苏氨酸(threonine); 蓝色线: 酪氨酸(tyrosine); 紫色线: 阈值(threshold)

Figure 2 Phosphated site prediction of *Vvhsp60* from *V. volvacea*. Red line: Serine; Green line: Threonine; Blue line: Tyrosine; Purple line: Threshold.

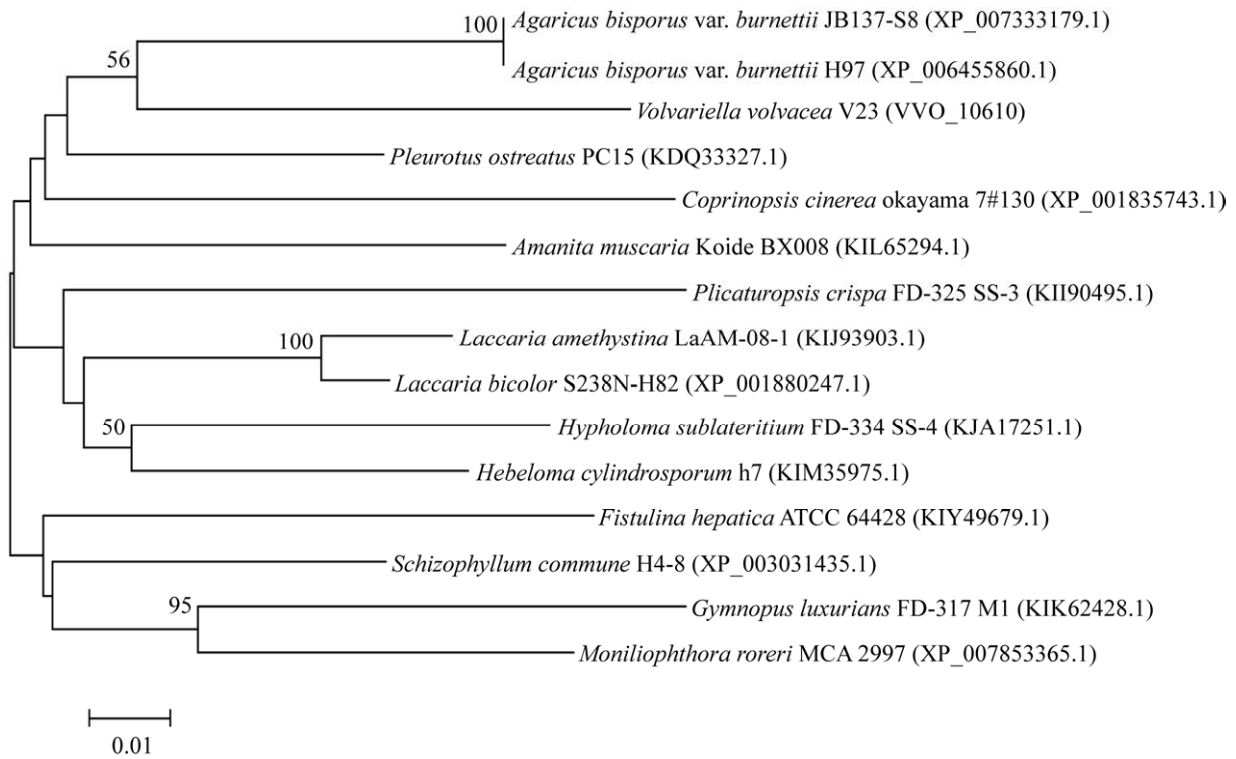


图3 部分真菌 HSP60 的系统发育树 括号中为不同真菌 HSP60 蛋白登录号; 距离标尺表示为单位长度置信值; 分支节点上的数字为 bootstrap 自展值

Figure 3 The phylogenetic tree of HSP60 from fungi. The accession numbers of different fungal HSP60 protein are in parentheses; At the branch nodes are 1 000 bootstrap replicates represented as percentage values; The distance scale is expressed as the confidence value of unit length.

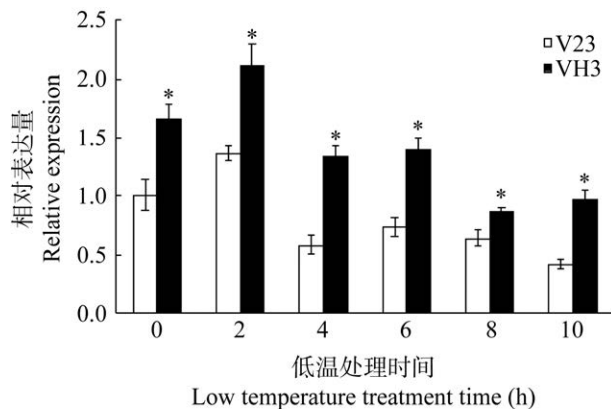


图4 低温处理不同时间 *Vvhsp60* 基因相对表达量变化

Figure 4 Relative expression of *Vvhsp60* gene under low temperature stress. *: $P < 0.05$.

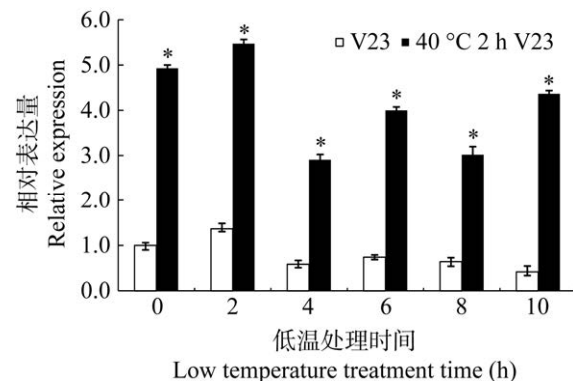


图5 低温处理不同时间下 V23 和 40 °C 2 h V23 中 *Vvhsp60* 基因的表达量变化

Figure 5 Relative expression of *Vvhsp60* gene during low temperature process in V23 and 40 °C 2 h V23. *: $P < 0.05$.

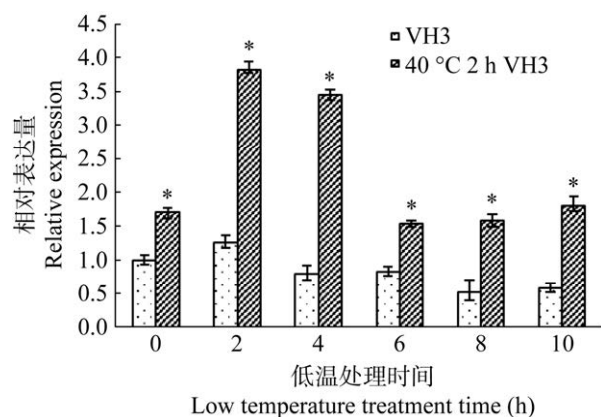


图 6 低温处理不同时间下 VH3 和 40 °C 2 h VH3 中 *Vvhsp60* 基因的表达量变化

Figure 6 Relative expression of *Vvhsp60* gene during low temperature process in VH3 and 40 °C 2 h VH3. *: $P < 0.05$.

3 讨论与结论

低温自溶的特性影响了草菇菌种保藏, 导致子实体采后保鲜期缩短, 严重制约了产业的快速发展, 探究草菇低温自溶机制成为亟待解决的科学问题。热激蛋白 HSP60 是一种应激蛋白, 能调节生物和非生物胁迫^[19-20], 参与真菌生命活动中的分化、感染和定殖^[21-22]。HSP60 受到胁迫时在 HSP70 的协助下修复变性蛋白质从而保持线粒体功能, 也可以通过维持线粒体的氧化磷酸化功能防止细胞凋亡^[23-24]。

本研究选用草菇低温敏感型菌株 V23 及耐低温菌株 VH3 为实验材料, 将二者的菌丝体于 0 °C 进行低温处理和 40 °C 热激 2 h 后再低温处理 0、2、4、6、8、10 h, 利用 RT-qPCR 分析热激蛋白 *Vvhsp60* 基因的表达量变化。本人所在团队一直致力于探究草菇的低温应答反应, 前期对热激蛋白 *Vvhsp90* 和 *Vvhsp100* 与低温耐受性的关系进行了研究, 对 *Vvhsp90*、*Vvhsp100* 和 *Vvhsp60* 蛋白质的生物信息学分析进行了汇总, 发现 3 种蛋白质性质相似; 基因相对表达量水平

结果参考文献[13-14], 发现热激处理显著提高了菌丝体中 *Vvhsp100*、*Vvhsp90* 和 *Vvhsp60* 基因的表达量, 有助于增强草菇对低温胁迫的耐受性; 但与 *Vvhsp90* 和 *Vvhsp100* 基因转录表达不同, 当草菇仅受低温胁迫时 *Vvhsp60* 基因的表达量在耐低温菌株 VH3 中的表达量显著高于低温敏感菌株 V23, 这为后续通过遗传改造的手段提高草菇的耐低温能力及应用提供了理论基础, 这是本研究的重要创新之处。前期团队成员曾初步探索了多种热激蛋白在草菇低温应答中的作用^[25]。本文对草菇热激蛋白 *Vvhsp60* 基因进行了系统性的生物信息学分析, 在此基础上, 进一步利用实时荧光定量 PCR 技术研究了低温胁迫及热激诱导后在低温下草菇菌丝体中 *Vvhsp60* 基因表达水平的变化, 结果表明 *Vvhsp60* 基因不仅在耐低温菌株 VH3 中高表达, 而且热激处理有效诱导了 *Vvhsp60* 基因的表达, 有助于提高草菇的耐低温性。在糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)中, 同样发现热胁迫借助热激蛋白 HSP60 表达的提高来缓解所引起的伤害^[26]。本研究结果同样显示, 热激蛋白 *Vvhsp60* 基因在受到低温胁迫初期相对表达量显著上升。在整个低温处理的过程中, 耐低温菌株 VH3 菌丝体中 *Vvhsp60* 基因的表达量要显著高于低温敏感型菌株 V23, 据此推测 *Vvhsp60* 与草菇的耐冷性具有一定的相关性。有报道指出, 热激有助于热激蛋白的诱导合成, 与耐冷性及耐热性相关^[27]。如通过 40 °C 高温处理糙皮侧耳 48 h 再恢复培养 3 d 后, 分析热激蛋白家族的转录情况, 结果表明热激蛋白表达量的增加对菌丝抗高温胁迫起到重要作用^[28]; 在 42 °C 热激处理诱导了热激蛋白的合成, 水稻(*Oryza sativa*)幼苗的耐冷性明显增强^[29]。本研究经热激处理后草菇菌丝体中 *Vvhsp60* 基因的表达量明显高于未进行热激处理的对照组, 表明热激处理诱导了草菇

Vvhsp60 的大量产生。热激蛋白 Vvhsp60 可能发挥了分子伴侣的作用, 帮助由于低温胁迫而造成的变性蛋白质重新折叠, 从而恢复其功能, 进而提高了草菇对低温的耐受性。

综上, 本研究表明 Vvhsp60 与草菇的耐冷性具有相关性, 而且热激处理可以增加 *Vvhsp60* 基因的表达量, 有助于提高草菇的耐低温性。

REFERENCES

- [1] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 1-21
Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH. A revised checklist of edible fungi in China[J]. Mycosystema, 2010, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- [2] Liu Z, Zhang K, Lin JF, Guo LQ. Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(1): 18-24
- [3] Bao DP, Gong M, Zheng HJ, Chen MJ, Zhang L, Wang H, Jiang JP, Wu L, Zhu YQ, Zhu G, et al. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58294
- [4] 栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 杨青川, 康俊梅. 植物热激蛋白研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 7-13
Li ZY, Long RC, Zhang TJ, Yang QC, Kang JM. Research progress on plant heat shock protein[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 7-13 (in Chinese)
- [5] Yang JK, Gu J, Hu YQ, Wang N, Gao JG, Wang P. Molecular cloning and characterization of *HSP60* gene in domestic pigeons (*Columba livia*) and differential expression patterns under temperature stress[J]. Cell Stress and Chaperones, 2021, 26(1): 115-127
- [6] 魏殿华, 高静雯, 汪晓轩, 张莉, 齐亚银. 急性冷应激对阿勒泰羊 *HSP60*、*HSP70* 和 *HSP90* 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(12): 3680-3689
Wei DH, Gao JW, Wang XX, Zhang L, Qi YY. Effects of acute cold stress on mRNA expression of *HSP60*, *HSP70* and *HSP90* genes in Altay sheep[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(12): 3680-3689 (in Chinese)
- [7] Kim JY, Yenari M. Heat shock proteins and the stress response[A]//Primer on Cerebrovascular Diseases[M]. Amsterdam: Elsevier, 2017: 273-275
- [8] Al-Whaibi MH. Plant heat-shock proteins: a mini review[J]. Journal of King Saud University-Science, 2011, 23(2): 139-150
- [9] Tereshina VM. Thermotolerance in fungi: the role of heat shock proteins and trehalose[J]. Microbiology, 2005, 74(3): 247-257
- [10] 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)
- [11] 贾培培. 真姬菇高温胁迫应答的蛋白组学差异表达分析[D]. 青岛: 青岛农业大学硕士学位论文, 2011
Jia PP. Differential expression in *Hypsizygos marmoreus* proteome in response to high temperature stress[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [12] 辛苗苗. 高温胁迫下香菇疏水蛋白和热激蛋白的转录表达量变化及功能研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
Xin MM. The gene expression and function study of hydrophobin and heat shock proteins from *Lentinula edodes*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [13] 赵妍, 杨焕玲, 黄金丽, 陈明杰, 王晨光, 任昀霏, 马丹丹. 热激处理对草菇耐冷性的影响及对 *hsp100* 基因的诱导[J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3036-3041
Zhao Y, Yang HL, Huang JL, Chen MJ, Wang CG, Ren YF, Ma DD. The effect of heat treatment on adaptation of *Volvariella volvacea* to low temperature stress and on relative expression of *hsp100* gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(8): 3036-3041 (in Chinese)
- [14] 黄金丽, 赵妍, 辛苗苗, 宋晓霞, 陈明杰. 热激处理对草菇耐冷性的影响及对 *hsp90* 基因的诱导[J]. 上海农业学报, 2017, 33(1): 15-20
Huang JL, Zhao Y, Xin MM, Song XX, Chen MJ. Effect of heat treatment on adaptation of *Volvariella volvacea* to low temperature stress and on relative expression of *hsp90* gene[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2017, 33(1): 15-20 (in Chinese)
- [15] 秦佳, 杨金莹, 伊淑莹, 赵春梅, 李明辉, 刘箭. 组成型表达的 *ClpB* 基因提高番茄植株的耐冷性[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 16-20
Qin J, Yang JY, Yi SY, Zhao CM, Li MH, Liu J.

- Improvement of chilling tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant by constitutive expression of *ClpB* gene[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 43(1): 16-20 (in Chinese)
- [16] 全宗军, 严俊杰, 张磊, 黄蓉梅, 徐伟南, 韩星, 许鸣凤, 陶永新, 谢宝贵. 金针菇转运蛋白基因 *fv-mfs1* 的序列与表达分析[J]. *食用菌学报*, 2017, 24(3): 1-6, 107
- Tong ZJ, Yan JJ, Zhang L, Huang RM, Xu WN, Han X, Xu MF, Tao YX, Xie BG. Sequence and expression analysis of transporter protein gene *fv-mfs1* in *Flammulina velutipes*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2017, 24(3): 1-6, 107 (in Chinese)
- [17] 杨焕玲, 全宗军, 赵妍, 蒋俊, 查磊, 陈明杰. 香菇锰过氧化物酶基因(*LeMnPI*)生物信息学分析及高温胁迫下的表达[J]. *菌物学报*, 2020, 39(6): 1056-1064
- Yang HL, Tong ZJ, Zhao Y, Jiang J, Zha L, Chen MJ. Bioinformatics analysis of manganese peroxidase gene (*LeMnPI*) in *Lentinula edodes* and effects of high temperature stress on its expression[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(6): 1056-1064 (in Chinese)
- [18] Zhao X, Yang HL, Chen MJ, Song XX, Yu CX, Zhao Y, Wu YJ. Reference gene selection for quantitative real-time PCR of mycelia from *Lentinula edodes* under high-temperature stress[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 1670328
- [19] Tsan MF. Heat shock protein and innate immunity[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2004, 1(4): 274-279
- [20] Cappello F, Bellafiore M, Palma A, David S, Marcianò V, Bartolotta T, Sciumè C, Modica G, Farina F, Zummo G, et al. 60 kDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis[J]. *European Journal of Histochemistry*, 2003, 47(2): 105-110
- [21] Cunha DA, Zancopé-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr, Soares CMA. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant *HSP60* from *Paracoccidioides brasiliensis*[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2002, 9(2): 374-377
- [22] Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos ÉG, Moraes LMP, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(26): 24706-24714
- [23] Chow AM, Beraud E, Tang DWF, Ferrier-Pagès C, Brown IR. Hsp60 protein pattern in coral is altered by environmental changes in light and temperature[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 161(3): 349-353
- [24] 刘骜骜, 刘燕敏, 李阳. 植物热激蛋白在非生物胁迫响应中的研究进展[J]. *广东蚕业*, 2020, 54(4): 25-26
- Liu SS, Liu YM, Li Y. Research progress of plant heat shock proteins in response to abiotic stress[J]. *Guangdong Sericulture*, 2020, 54(4): 25-26 (in Chinese)
- [25] 黄金丽. 热激蛋白在草菇应答低温胁迫中的作用研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2016
- Huang JL. The role of HSPs in *Volvariella volvacea* resistance to low temperature stress[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese)
- [26] 药欣荣, 高巍, 张金霞, 常明昌, 黄晨阳, 邹向丽. 高温胁迫下糙皮侧耳胞内钙离子对热激蛋白基因表达的调控[J]. *食用菌学报*, 2019, 26(2): 17-23
- Yao XR, Gao W, Zhang JX, Chang MC, Huang CY, Wu XL. The regulation of cytosolic Ca^{2+} on gene expression of heat shock proteins in *Pleurotus ostreatus* under heat stress[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2019, 26(2): 17-23 (in Chinese)
- [27] 余昌霞, 杨焕玲, 赵妍, 黄金丽, 李正鹏, 查磊, 董沁, 陈明杰. 草菇 *smHsp* 基因生信分析及热激对其在低温下表达的诱导[J]. *分子植物育种*, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210604.1038.006.html>
- Yu CX, Yang HL, Zhao Y, Huang JL, Li ZP, Zha L, Dong Q, Chen MJ. Bioinformatics analysis of *smHsp* gene in *Volvariella volvacea* and heat shock treatment induced its relative expression under low temperature stress[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210604.1038.006.html> (in Chinese)
- [28] 张美敬. 高温胁迫下平菇蛋白组学研究及抗性分析[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2016
- Zhang MJ. Proteomics research under heat stress and resistance analysis of *Pleurotus* spp.[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2016 (in Chinese)
- [29] 黄上志, 黄祥富, 林晓东, 张以顺, 刘军, 傅家瑞. 热激对水稻幼苗耐冷性及热激蛋白合成的诱导[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(2): 189-194
- Huang SZ, Huang XF, Lin XD, Zhang YS, Liu J, Fu JR. Induction of chilling tolerance and heat shock protein synthesis in rice seedlings by heat shock[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2004, 30(2): 189-194 (in Chinese)