



研究报告

环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的克隆及在不同胁迫条件下的表达检测

李良德 李金玉 王定锋* 吴光远*

福建省农业科学院茶叶研究所 福建 福州 350013

摘要:【背景】环链棒束孢(*Isaria cateinannulata*)是一种重要的虫生真菌,许多环境因子的胁迫作用影响了该菌在田间的生防效果。【目的】热休克蛋白酪蛋白溶解蛋白酶(Heat Shock Protein Casein Lytic Proteinase, Hsp100/Clp)是一类 ATP 依赖型 Hsp100 家族蛋白,克隆该菌株 Hsp100/ClpB 家族的 2 个关键基因 *IcHsp104* 与 *IcHsp78*,探索该对基因在应对不同温度及盐浓度胁迫下的作用。【方法】通过前期获得的转录组数据库,采用本地 BLAST 方法对环链棒束孢 *Hsp100* 家族基因进行分析筛选。通过 RT-PCR 技术,对环链棒束孢 *Hsp100* 基因的编码区(Open Reading Frame, ORF)进行碱基验证。通过分子生物信息学分析软件,对环链棒束孢 *Hsp100* 基因的氨基酸结构、进化树、功能结构域和三级结构进行分析。通过不同温度及盐浓度处理菌株,采用荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative PCR, RT-qPCR)技术,对获得的基因进行表达检测。【结果】共筛选出 2 个环链棒束孢 Hsp100/ClpB 基因 *Hsp104* 与 *Hsp78*,将其命名为 *IcHsp104* 与 *IcHsp78*,2 个基因分别编码 923 个和 805 个氨基酸,分子量分别为 103.199 kD 和 88.805 kD;2 个基因均与棒束孢属、白僵菌属和虫草属 3 个物种的亲缘关系最近,但 2 个基因之间的同源性较低;2 个基因编码的蛋白均为经典的 AAA⁺-ATPase 家族蛋白,三级结构以 α 螺旋为主。另外,经高低温处理菌株后,2 个基因的表达均会上调,并随处理时间的延长上升越显著,而且高温胁迫组显著强于低温组。经不同浓度氯化钠处理后,低浓度组 2 个基因的表达量均上调,高浓度组 2 个基因的表达量均受到抑制。【结论】环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因在抵抗外界温度及盐胁迫过程中起到重要的作用,为后续环链棒束孢应对环境胁迫的机理研究提供了理论基础。

关键词: 环链棒束孢, 热休克蛋白, 生物信息学, 温度胁迫, 盐胁迫

Foundation item: Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01099)

*Corresponding authors: Tel: 86-591-87922826

E-mail: WANG Dingfeng: wangdf2013@yahoo.com; WU Guangyuan: gywupt@163.com

Received: 25-09-2020; Accepted: 24-12-2020; Published online: 12-03-2021

基金项目: 福建省自然科学基金(2015J01099)

*通信作者: Tel: 0591-87922826

E-mail: 王定锋: wangdf2013@yahoo.com; 吴光远: gywupt@163.com

收稿日期: 2020-09-25; 接受日期: 2020-12-24; 网络首发日期: 2021-03-12

Molecular cloning, expression detection of *IcHsp104* and *IcHsp78* genes under different stress conditions in *Isaria cateinannulata*

LI Liangde LI Jinyu WANG Dingfeng* WU Guangyuan*

Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China

Abstract: [Background] *Isaria cateinannularis* is an important entomogenous fungus, and its biocontrol efficiency in the field is affected by the stress of many environmental factors. [Objective] Hsp100/ClpB is a class of ATP-dependent Hsp100 family protein, to clone two crucial Hsp100/ClpB (heat shock protein, casein lytic proteinase B) family genes *IcHsp104* and *IcHsp78* from *Isaria cateinannulata*, and to explore its role in response to different temperatures and concentrations salt stress. [Methods] The *Hsp100* family genes were analyzed and screened by BLAST method using transcriptomic database obtained in early stage. RT-PCR technologies were used to verify the open reading frame (ORF) sequence of *Isaria cateinannulata Hsp100* genes. The amino acid structure, phylogenetic tree, functional domain and tertiary structure of *Isaria cateinannulata Hsp100* genes were analyzed by molecular bioinformatics analysis software. The expression of *Isaria cateinannulata Hsp100* genes were detected by RT-qPCR technology after the fungus were treated with different temperature and salt concentration. [Results] A pair of Hsp100/ClpB genes *Hsp104* and *Hsp78* were screened and named *IcHsp104* and *IcHsp78*, which encoded 923 and 805 amino acids, and their molecular weights were 103.199 kD and 88.805 kD, respectively. The relationship of both genes were close to *Isaria* spp., *Beauveria* spp. and *Cordyceps* spp., but it showed lower similarity between the two genes. The proteins encoded by the two genes were classic AAA⁺-ATPase family proteins, and the tertiary structure was mainly by alpha helix. In addition, after the treatment of high and low temperature, the expression levels of both genes were up-regulated, and increased more significantly with the extension of treatment time. Additionally, the effect of high temperature stress was significantly stronger than the low temperature stress. Then, in terms of the treatment of different concentrations of sodium chloride, the expression levels of both genes were up-regulated in the low concentration stress, while they were inhibited in the high concentration stress. [Conclusion] The *IcHsp104* and *IcHsp78* genes from *Isaria cateinannulata* play an important role in the response to external temperature and salt stress, those findings provide a theoretical basis for the further mechanism studies on *Isaria cateinannulata* responding to environmental stress.

Keywords: *Isaria cateinannulata*, heat shock protein, bioinformatics, temperature stress, salt stress

中国是茶叶之乡, 由于受茶树品种、栽培条件及害虫管理模式等因素的影响, 茶园小绿叶蝉(*Empoasca flavescens*)、茶尺蠖(*Ectropis oblique*)和茶丽纹象甲(*Mylokerinus aurolineatus*)等害虫的发生特别严重^[1-3], 对茶叶产量和品质造成了严重影响, 阻碍了我国茶产业的发展。市场上, 新烟碱类(Neonicotinoids)、拟除虫菊酯类(Pyrethroids)和氨基甲酸酯类(Carbamates)等杀虫剂是防治茶园害虫的常见农药, 然而过多的使用化学农药导致茶园害虫产生了抗药性(Resistance)、再增猖獗(Resurgence)和农药残留(Residue)等“3R”问题。因

此, 寻求新的害虫防治策略是今后茶产业可持续发展健康发展的关键。

昆虫病原真菌已被开发为生物制剂并广泛应用于农林害虫的生物防治。例如, 环链棒束孢(*Isaria cateinannulata*), 别名环链拟青霉, 隶属于棒束孢属, 是一种非常重要的茶园虫生真菌。通过对昆虫病原真菌群落和生态多样性的分析发现, 环链棒束孢(*I. cateinannulata*)是茶园内的优势种, 对多种茶叶害虫, 如茶小绿叶蝉(*E. flavescens*)、茶卷叶蛾(*Homona coffearia*)和茶小卷叶蛾(*Adoxophyes honmai*)等具有极强的致病

性^[4-5];对其他害虫,如小菜蛾(*Plutella xylostella*)、柳杉瘿蚊(*Resseliella odai*)、桃蚜(*Myzus persicae*)等也具有较好的生物防治潜力^[6]。然而,在菌株野外使用期间,空气温度、湿度、太阳紫外线辐射和田间残留农药等环境因素,都会直接或间接地影响到菌株对靶标害虫的杀虫活性^[7-8]。

热休克蛋白(Heat Shock Protein, Hsp),又称热激蛋白,是生物体受到外界逆境胁迫后体内大量合成的一类蛋白质。该蛋白普遍存在于原核生物与真核生物中,在真菌抵抗外界环境胁迫时发挥着重要作用。早在1962年,Ritossa^[9]在短暂热激处理黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)唾腺组织(Salivary Gland Tissue)时首次发现热激蛋白,之后在高等动物也发现了该蛋白的存在。按照Hsp分子量大小的不同,可将Hsp归类为大分子Hsp(大于80 kD)、中分子Hsp(30–70 kD)和小分子Hsp(15–50 kD)三大家族^[10]。也可将Hsp进行细分,包含Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp40、Hsp20和Hsp10等^[11]。前人研究结果表明,Hsp不仅在高温条件下能被诱导,同时在低温、干燥、高盐、高pH值、饥饿、缺氧、水分胁迫和紫外照射等逆境条件下也能起到防止蛋白质凝聚或变性的重要作用^[12-13]。

虽然Hsp的作用机制在高等动植物和昆虫中已研究得比较深入,但在虫生真菌中的研究少有报道。目前环链棒束孢在茶园害虫防治中已得到初步应用,但菌株活性往往受到茶园气候、温度、湿度及盐胁迫等不利因素的影响。热休克蛋白酪蛋白溶解蛋白酶(Heat Shock Protein Casein Lytic Proteinase, Hsp100/Clp)是一类ATP依赖型Hsp100家族蛋白(ATPase Associated with a Variety of Cellular Activities, AAA⁺-ATPase),其中ClpB(Casein Lytic Proteinase B)是Hsp100/Clp蛋白家族(包含Hsp100/ClpA–D)的重要一员,该家族主要由Hsp104与Hsp78这2个基因组成,具有分子伴侣功能,可有效地抑制因逆境胁迫而产生的蛋白变性聚集^[13]。

基于此,本研究从前期获得的转录组数据库^[6]筛选出了2个具有密切联系的Hsp100/ClpB基因(IcHsp104与IcHsp78),对获得的Hsp100/ClpB基因进行碱基验证与生物信息学分析,并检测了在不同温度及盐浓度胁迫的表达水平,以期为后续探索该菌株的逆境胁迫机理及菌株靶标基因的改造提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和样品采集

供试环链棒束孢菌株分离自茶卷叶蛾(*Homona coffearia*)的僵虫^[6]。菌株培养于pH 7.2的马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)斜面培养基,并于4 °C冰箱中长期保存备用。PDA培养基(g/L):马铃薯200.0,葡萄糖20.0,琼脂20.0。

1.1.2 主要试剂和仪器

总RNA提取试剂盒Easestep™ Total RNA Extraction Kit、总RNA反转试剂盒GoScript™ Reverse Transcription System、DNA凝胶回收试剂盒DNA Gel Extraction Kit,碧云天生物技术研究所以;荧光定量PCR试剂盒TaqMan Real-Time PCR Master Mixes和荧光染料SYBR® Green, Thermo Fisher Scientific公司;荧光定量所用八连管、克隆所用dNTPs(各2.5 mmol/L)、Taq DNA聚合酶和DNA Marker 2000等,TaKaRa公司;转化所用载体pUCm-T,生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR仪,Eppendorf公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;凝胶成像系统,Invitrogen公司;荧光定量PCR仪,Bio-Rad公司;扫描电子显微镜,成都西野贸易有限公司。

1.2 方法

取出存放于4 °C冰箱的菌株,将菌株重新接种至新的PDA斜面培养基,于22.5 °C恒温培养箱中培养21 d后,取菌丝体用液氮迅速冷冻,使

用 Eastep™ Total RNA Extraction Kit 提取 RNA 用于常规 PCR 克隆;同时,分别于低温(4 °C)和高温(45 °C)条件下,胁迫 10、20 和 40 min 后,取样用于冷热胁迫试验检测;另外,在 PDA 溶液中加入 NaCl,分别配制成浓度为 0.5 mol/L 和 1.0 mol/L 培养基,而后将菌株重新接种至不同盐浓度的培养基中,于 22.5 °C 恒温培养箱中培养 21 d 后,取样用于盐胁迫试验检测。以上冷、热和盐胁迫试验均使用生长良好、未被污染的菌株,各组试验均重复 3 次。

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 模板的合成

参照 Eastep™ Total RNA Extraction Kit 的操作步骤,取事先冷冻的环链棒束孢样品 50 mg,先用液氮迅速冷冻,放至研磨器中,磨至粉状后提取总 RNA (Total RNA),并进行琼脂糖电泳,检测所提取 RNA 的完整性。之后,参照 GoScript™ Reverse Transcription System 的操作步骤,将提取的 RNA 作为模板,反转成 PCR 扩增所需要的 cDNA 模板。

1.2.2 环链棒束孢 *Hsp100/ClpB* 基因的克隆

根据前期获得的环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的基因序列,分别设计了 *Hsp104-F1/Hsp104-R1* 和 *Hsp78-F1/Hsp78-R1* 这 2 对引物(表 1)。采用 RT-PCR 技术,以前期获得的环链棒束孢 cDNA 为模板,对 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因的编码区(Open Reading Frame, ORF)序列进行碱基验证。RT-PCR 反应体系: cDNA 模板 0.5 μg, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, *Taq* 聚合酶(2.5 U/μL) 0.5 μL, *Taq* Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 5 μL, ddH₂O 补至 10.0 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 59.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 10 min。收取目的条带,与载体 pUCm-T 进行连接重组,利用大肠杆菌 DH5α 感受态细胞进行转化,培养后进行测序。

1.2.3 环链棒束孢 *Hsp100/ClpB* 基因的生物信息学分析

IcHsp104 与 *IcHsp78* 这 2 个基因编码蛋白的

分子量、理论等电点、分子式、原子总数和疏水性等由 ProtParam 分析网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析得到;编码蛋白的保守性分析由 Multalin 5.4.1 网站(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)比对获得;编码蛋白的功能结构域由 Smart 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析得到;所构建的系统进化树由 NCBI 下载近缘物种,导入 MEGA 6.0 软件,采用邻接法(Neighbor-Joining Method, NJ Method),并对 Bootstrap 值进行 1 000 次重复自展检验建树获得;最后,由 Swiss Model 网站(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)对其编码蛋白进行三级结构预测。

1.2.4 环链棒束孢 *Hsp100/ClpB* 基因的表达检测

根据已获得的 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因序列,分别设计了 *Hsp104-F2/Hsp104-R2* 和 *Hsp78-F2/Hsp78-R2* 这 2 对荧光定量引物。同时,选取环链棒束孢 *GAPDH* 为内参基因,设计一对 *GAPDH-F/GAPDH-R* 为内参引物,用于荧光定量 RT-qPCR 定量检测^[6](表 1)。

将前期冷热胁迫处理所获得的 9 组样品(低温、常温、高温共 3 种处理,10、20、40 min 共 3 个时间点取样,累计 9 组样品),以及不同浓度盐胁迫处理所获得的 3 组样品(对照组、低盐组、高盐组,累计 3 组样品)进行液氮处理后,参照 Eastep™ Total RNA Extraction Kit 的操作步骤提取总 RNA,并反转录成用于 RT-qPCR 的 cDNA 模板。RT-qPCR 反应体系: 荧光染料 SYBR® Green 10.0 μL, *Taq* 聚合酶(2.5 U/μL) 0.5 μL, cDNA 模板 0.5 μg, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, 补 ddH₂O 至 20.0 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 59.5 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 32 循环。最后,采用比较 C_T 值法的相对定量法(2^{-ΔΔC_T}),计算出 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 在不同温度及盐胁迫下的表达含量。

将 0、0.5 和 1.0 mol/L 浓度 NaCl 处理 21 d 后的菌株,通过扫描电子显微镜进一步观察。样品的制备过程为: (1) 用 3%戊二醛固定过夜,用

表 1 本实验克隆及定量所用引物

Table 1 Primers used in cloning and quantifying in this study

基因 Genes	目的 Purposes	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>IcHsp104</i>	ORF 片段克隆	<i>Hsp104</i> -F1	AACCCCTGTTTGATCTGTACAGA
	Cloning of ORF fragment	<i>Hsp104</i> -R1	AATTGTGCAGCGTACAGGCCAA
	荧光定量 PCR	<i>Hsp104</i> -F2	TGTGCGGAGTCGGGTGA
	RT-qPCR	<i>Hsp104</i> -R2	GGCCGCCGATCTCAAGTA
<i>IcHsp78</i>	ORF 片段克隆	<i>Hsp78</i> -F1	AACCCCTGTTTGATCTGTACAGA
	Cloning of ORF fragment	<i>Hsp78</i> -R1	TAATTGTGCAGCGTACAGGCCAA
	荧光定量 PCR	<i>Hsp78</i> -F2	GGAATCGCCGAGCTAACG
	RT-qPCR	<i>Hsp78</i> -R2	TGAGGAGCGACTGAAGAAGGT
<i>GAPDH</i>	内参引物	<i>GAPDH</i> -F	GAGCATGTAGGCAGCGTAGTCG
	Internal primer	<i>GAPDH</i> -R	GGTTGGCATCAACGGTTTCG

0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液浸洗 3 次，每次 10 min。(2) 用 30%、50%、70%、90%和 100%的乙醇逐级脱水，每个级别用时 10 min；100%的乙醇脱水 2 次，之后用醋酸正戊酯将乙醇置换出来，共置换 2 次，每次 15 min。(3) 用冷冻干燥仪，采用 CO₂ 临界点干燥法干燥 2 h，将样品粘于样品台上，采用扫描电子显微镜进行拍照。

1.3 数据统计与分析

不同温度(9 组)和盐(3 组)胁迫处理试验中，每组试验重复 3 次。所获得的定量数据，于 Microsoft Excel 2010 软件中，采用平均值±标准误(Mean±SE)进行制图；并使用 SPSS 13.0 软件，对每组数据采用邓肯氏单因素方差方法(One-Way ANOVA)进行显著性差异分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 环链棒束孢 *Hsp100/ClpB* 基因的克隆

通过前期获得的环链棒束孢转录组数据库，筛选出 2 个 *Hsp100/ClpB* 家族基因，将其命名为 *IcHsp104* 和 *IcHsp78*。通过设计 *Hsp104*-F1/R1 与 *Hsp78*-F1/R1 这 2 对引物(表 1)，采用 RT-PCR 克隆技术，对 *IcHsp104* 和 *IcHsp78* 基因的蛋白编码区 ORF 进行碱基验证，分别获得了 2 817 bp 与 2 464 bp 的 ORF 条带(图 1)。去掉相应引物后，*IcHsp104* 和 *IcHsp78* 基因的 ORF 长度分别为 2 772 bp 和 2 418 bp；进一步分析发现，*IcHsp104* 和 *IcHsp78*

分别编码 923 个和 805 个氨基酸。所编码蛋白的分子量(Molecular Weight)分别为 103.199 kD 和 88.805 kD，理论等电点(Theoretical pI)分别为 5.57 和 6.41，分子式(Molecular Formula)分别为 C₄₄₉₃H₇₃₆₂N₁₃₁₄O₁₄₀₃S₃₀ 和 C₃₉₀₂H₆₃₉₃N₁₁₂₉O₁₁₉₈S₁₆，原子总数(Total Number of Atoms)分别为 14 602 个和 12 638 个，平均疏水性(Grand Average of Hydropathicity, GRAVY)分别为-0.450 和-0.312。

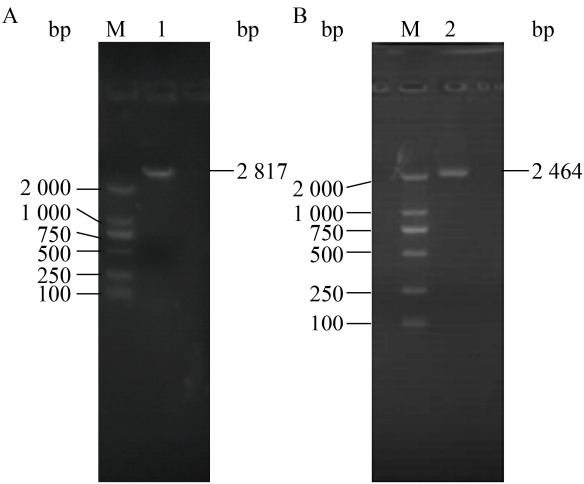


图 1 环链棒束孢 *IcHsp104* 和 *IcHsp78* 基因的 ORF 扩增
Figure 1 Amplification of *IcHsp104* and *IcHsp78* ORF genes from *Isaria cateniannulata*

注：M：DL2000 DNA Marker；1： *IcHsp104* 基因的 PCR 扩增产物；2： *IcHsp78* 基因的 PCR 扩增产物
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Amplification products of the *IcHsp104* gene; 2: Amplification products of the *IcHsp78* gene

分析可知,环链棒束孢 *IcHsp104* 和 *IcHsp78* 均与玫烟色棒束孢 (*I. fumosorosea*)、球孢白僵菌 (*B. bassiana*)、蛹虫草 (*C. militaris*) 3 个物种的亲缘关系最近。另外,环链棒束孢 *IcHsp104* 与异源热丝酵母 (*T. heterothallicus*)、镰刀菌 (*F. oxysporum*) 和木霉菌 (*T. gamsii*) 的亲缘关系最远,而环链棒束孢 *IcHsp78* 与嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*)、球毛壳菌 (*C. globosum*) 和甜菜双歧杆菌 (*D. exigua*) 的亲缘关系最远。

2.2.2 氨基酸同源性分析

通过氨基酸序列比对网站比对了环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白的同源性,结果显示,2 个蛋白的氨基酸同源性较低,仅为 55% 左右(图 3),表明 Hsp100/ClpB 家族蛋白在环链棒束孢中保守性较弱。

2.2.3 功能结构域分析

通过 Smart 分析网站对环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白进行了功能结构域分析,结果显示,2 个蛋白均为经典的 ATP 依赖型 HSP100 家族蛋白 (AAA⁺-ATPase)。其中, *IcHsp104* 的 AAA⁺-ATPase 结构域位于编码蛋白 N 端的 216–361 位点与 C 端的 627–771 位点(图 4A), *IcHsp78* 蛋白的 AAA⁺-ATPase 结构域位于编码蛋白 N 端的 121–266 位点与 C 端的 520–660 位点(图 4B)。

进一步分析发现, *IcHsp104* 蛋白的头部 N 端包含一个 Clp (Casein Lytic Proteinase, 酪蛋白溶解蛋白酶) 功能结构域 (Pfam, Clp_N), 位于蛋白的 110–161 位点; 中间包含一段较长的连接区, 具有一个双螺旋结构域 (Coiled Coil Region), 位于蛋白的 429–518 位点(图 4A 中绿色部分); 尾部 C 端包含一个 ClpB (Casein Lytic Proteinase B, 酪蛋白溶解蛋白酶 B) 功能结构域 (ClpB_D2-small), 位于蛋白的 798–889 位点。类似地, 分析 *IcHsp78* 蛋白发现, 该蛋白头部 N 端不包含 Clp 功能结构域, 但中间包含一个双螺旋结构域, 位于蛋白的

332–414 位点; 尾部包含一个 ClpB 功能结构域, 位于蛋白的 698–787 位点(图 4B)。

2.2.4 三级结构模拟

利用 Swiss Model 在线网站对环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白进行三级结构“3D”模拟, 结果显示, 环链棒束孢 *IcHsp104* (图 5A) 与 *IcHsp78* (图 5B) 蛋白主要由 α 螺旋结构和少数 β 折叠结构组成; 另外, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白“3D”结构的 QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis, 数值范围为 -4–0, 越接近 0 表示模型质量越好) 分别为 -0.82 与 -1.46, 以及 GMQE (Global Model Quality Estimation, 数值范围为 0–1, 越接近 1 表示建模可信度越高) 分别为 0.72 与 0.68, 说明“3D”模型可信。

2.3 环链棒束孢 *Hsp100/ClpB* 基因胁迫下的表达检测

2.3.1 冷热胁迫处理

分别采用低温 (0 °C)、常温 (22.5 °C) 和高温 (45.0 °C) 处理环链棒束孢, 观测菌株 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因在冷热胁迫下的表达情况。由图 6 可以看出, 与对照组 (常温组) 相比, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因不管是在低温或者是高温条件胁迫下, 2 个基因的表达均会被诱导上升, 而且随着处理时间的延长, 2 个基因的表达量上升越显著, 但高温胁迫下 2 个基因的表达含量显著高于低温胁迫处理组(图 6)。

分析发现, 与常温组 (22.5 °C) 相比, *IcHsp104* 基因在冷与热胁迫条件下, 处理 10 min 分别上升了 1.83 倍和 33.65 倍, 处理 20 min 分别上升了 2.47 倍和 59.01 倍, 处理 40 min 分别上升了 23.53 倍和 130.35 倍(图 6A)。同样地, 与常温组 (22.5 °C) 相比, *IcHsp78* 基因在冷与热胁迫条件下, 处理 10 min 分别上升了 3.53 倍和 48.35 倍, 处理 20 min 分别上升了 2.91 倍和 72.16 倍, 处理 40 min 分别上升了 33.07 倍和 139.17 倍(图 6B)。

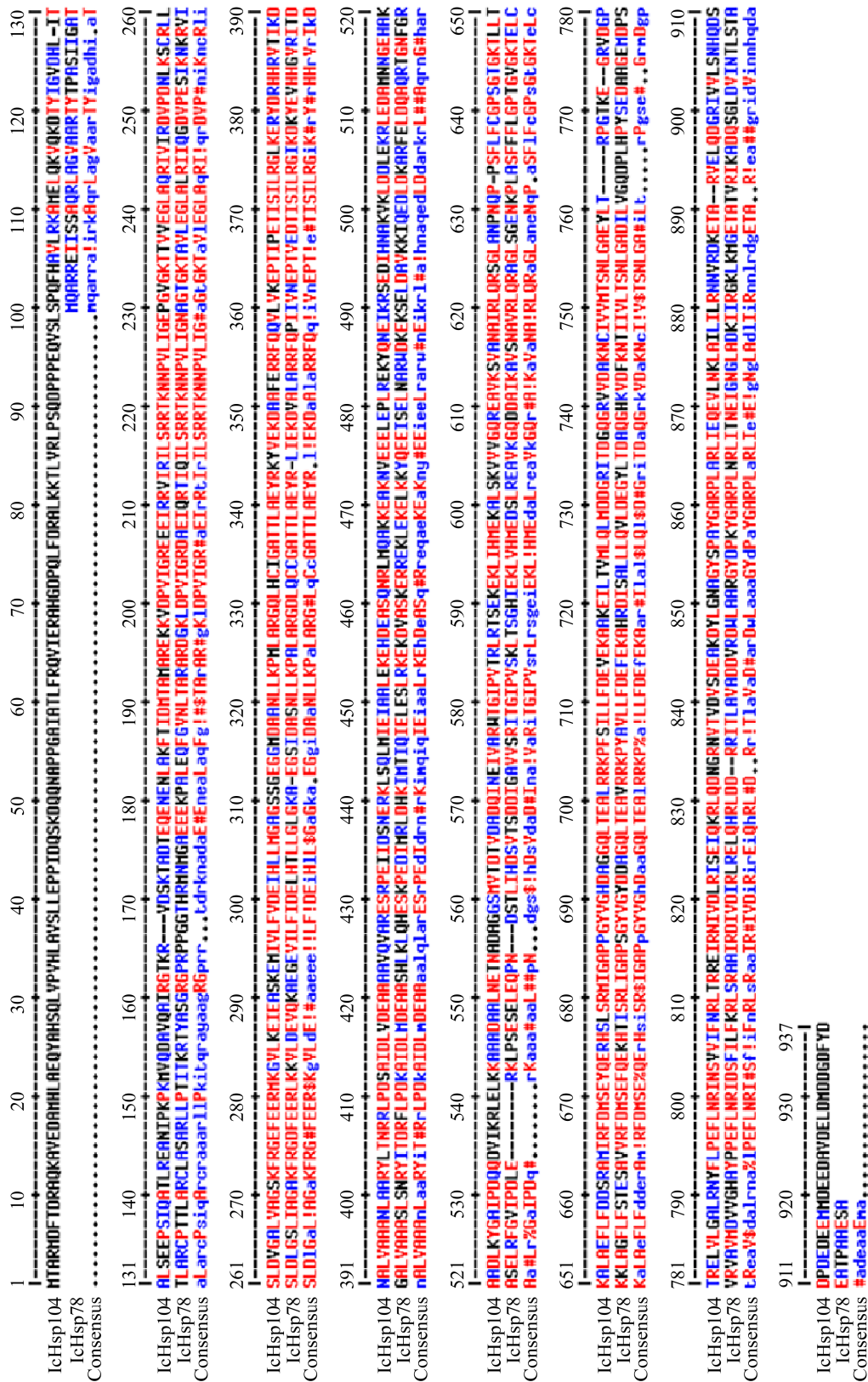
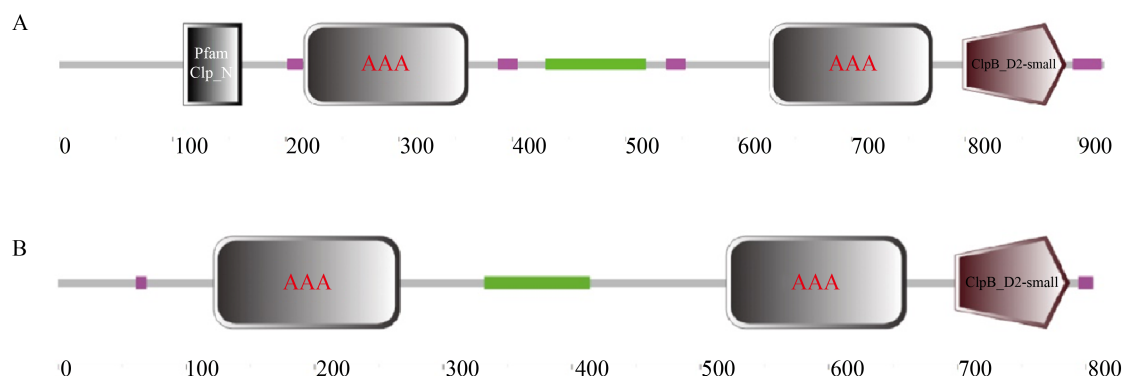
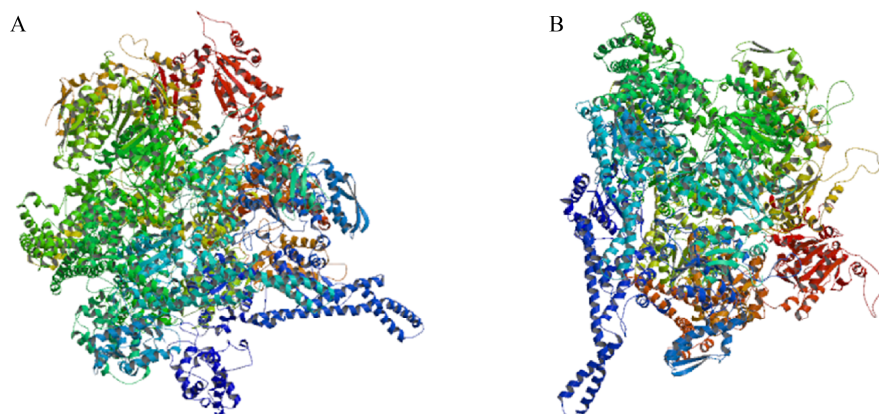
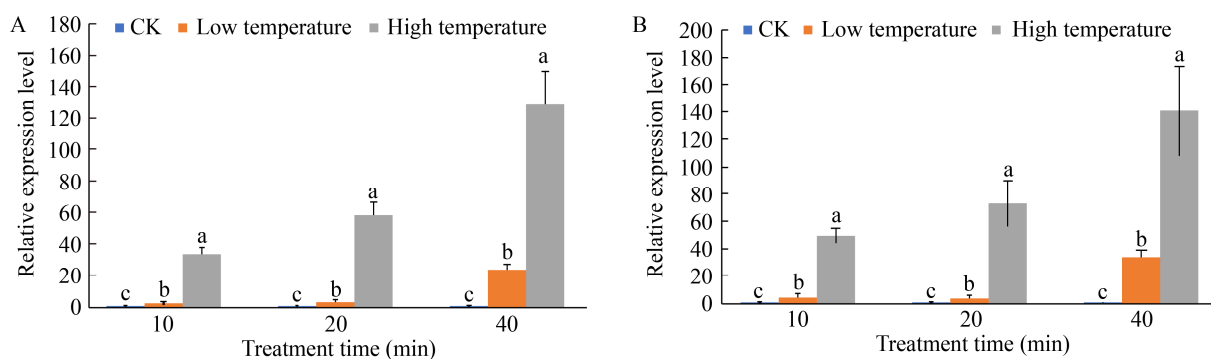


图 3 环链棒束抱 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白的同源性比对

Figure 3 Alignment of amino acid sequences of *IcHsp104* and *IcHsp78* proteins from *Isaria catenianum*

注: 红色和蓝色分别代表氨基酸序列相同或不同

Note: Colour of red and blue indicate the same or different amino acid sequence, respectively

图 4 环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的蛋白功能结构域Figure 4 Functional domains of *IcHsp104* and *IcHsp78* proteins from *Isaria catenianulata*图 5 环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的蛋白三级结构Figure 5 Tertiary structure of *IcHsp104* and *IcHsp78* protein from *Isaria catenianulata*图 6 不同温度胁迫后 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的相对表达量Figure 6 Relative expression levels of *IcHsp104* and *IcHsp78* genes after different temperature treated

注：A: *IcHsp104* 在不同温度胁迫后的相对表达量；B: *IcHsp78* 在不同温度胁迫后的相对表达量。试验以 GAPDH 为内参，以常温处理组为对照，数据采用平均值±标准误的方法进行分析，柱上不同字母代表相同时间处理组之间的表达量存在显著性差异 ($P<0.05$)，每组实验重复 3 次

Note: A: Relative expression levels of *IcHsp104* gene after different temperature treated; B: Relative expression levels of *IcHsp78* gene after different temperature treated. GAPDH was used as the internal reference, and the group treated with normal temperature was used as the control group. Data were analyzed by means of mean±SE in triplicate, different letters on the column represented significant differences among the same time treatment groups ($P<0.05$), and the experiment was repeated for three times in each group

2.3.2 盐胁迫处理

分别采用 0、0.5 和 1.0 mol/L 浓度的 NaCl 处理环链棒束孢 21 d 后, 观测菌株的生长形态。由图 7 可以看出, 未做 NaCl 处理的菌株(对照)生长旺盛, 菌株接近长满于玻璃皿, 粉末状孢子长满于内凹中央, 并向菌株外围扩散(图 7A); 然而经 0.5 mol/L 浓度 NaCl 处理的菌株生长弱于对照组, 粉末状孢子较少, 仅局部生长于内凹中央(图 7B); 当 NaCl 浓度达到 1.0 mol/L 处理时, 菌株生长受到严重抑制, 几乎不产粉末状孢子(图 7C)。

在此基础上, 通过扫描电子显微镜对不同处理组的菌株做了进一步观察, 结果表明: 未做 NaCl 处理的菌株(对照)可见球状孢子, 形态大且圆, 分布于菌丝中间(图 7D) (箭头处); 经 0.5 mol/L 浓度 NaCl 处理的菌株也可见球状孢子及菌丝, 但孢子小于对照组(图 7E) (箭头处); 经 1.0 mol/L 浓度 NaCl 处理的菌株只能见菌丝未能找到孢子(图 7F)。

经 0、0.5 和 1.0 mol/L 浓度的 NaCl 处理环链

棒束孢 21 d 后, 分别取对应的 3 组样品, 检测环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因在 NaCl 胁迫下的表达情况。试验结果表明, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因经低浓度 NaCl (0.5 mol/L) 处理后, 2 个基因的表达量分别上升了 195.73% 和 401.60%; 然而经高浓度 NaCl (1.0 mol/L) 处理后, 2 个基因的表达量分别下降了 64.34% 和 59.33% (图 8)。以上结果表明, 环链棒束孢 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因经低浓度盐胁迫后表达将受到诱导上升, 而经高浓度盐胁迫后表达将受到抑制下降。

3 讨论与结论

Hsp100/Clp 广泛存在于高等动植物和真菌中, 是一类 ATP 依赖型(AAA⁺-ATPase)家族蛋白, 其中 ClpB 是 Clp 家族的重要一员, 该家族主要由 *Hsp104* 与 *Hsp78* 这 2 个基因组成。本研究通过获得的环链棒束孢转录组数据库, 筛选并克隆了这对 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因。采用 ProtParam

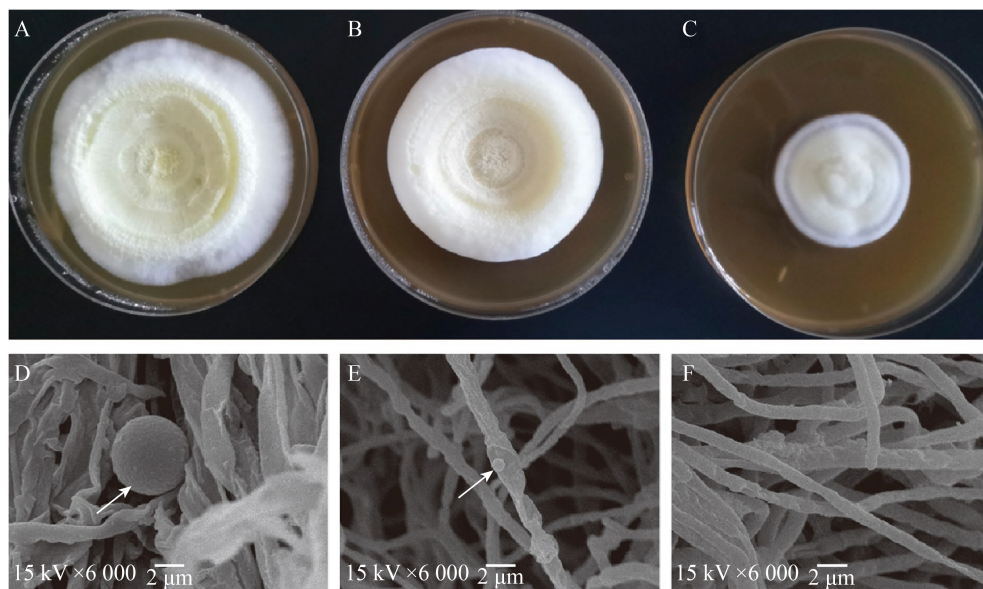


图 7 不同浓度 NaCl 处理环链棒束孢 21 d 后的生长形态

Figure 7 Growth morphology of *Isaria catenianulata* after treated with different concentrations of NaCl for 21 d

注: A: 对照组; B: 0.5 mol/L NaCl 处理; C: 1.0 mol/L NaCl 处理; D: 对照组扫描电镜图; E: 0.5 mol/L NaCl 处理扫描电镜图; F: 1.0 mol/L NaCl 处理扫描电镜图

Note: A: Control group; B: Treatment with 0.5 mol/L NaCl; C: Treatment with 1.0 mol/L NaCl; D: Scanning electron microscopy graph of control group; E: Scanning electron microscopy graph of 0.5 mol/L NaCl treatment group; F: Scanning electron microscopy graph of 1.0 mol/L NaCl treatment group

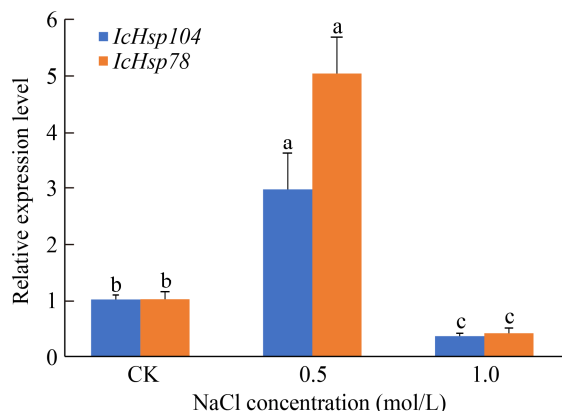


图 8 不同浓度盐胁迫后 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的相对表达量

Figure 8 Relative expression levels of *IcHsp104* and *IcHsp78* genes after different concentration of salt treated

注: A: *IcHsp104* 在不同浓度盐胁迫后的相对表达量; B: *IcHsp78* 在不同浓度盐胁迫后的相对表达量。试验以 GAPDH 为内参, 以未加 NaCl 的处理组为对照, 数据采用平均值±标准误差的方法进行分析, 柱上不同字母代表相同基因不同浓度处理组之间的表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 每组实验重复 3 次

Note: A: Relative expression levels of *IcHsp104* gene after different concentration of salt treated; B: Relative expression levels of *IcHsp78* gene after different concentration of salt treated. GAPDH was used as the internal reference, and the group without NaCl treatment was used as the control group. Data were analyzed by means of mean±SE in triplicate, different letters on the column represented significant differences among different concentration treatment groups in same gene ($P < 0.05$), and the experiment was repeated for 3 times in each group

分析发现, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 基因分别编码 923 个和 805 个氨基酸, 这与 NCBI 登录的蛹虫草 (*C. militaris*) 和球孢白僵菌 (*B. bassiana*) 完全一致。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 Hsp104 与 Hsp78 两者的氨基酸序列同源性较低, 仅为 65%, 而蛋白的保守性仅为 44%^[14], 本研究结果 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 蛋白的保守性为 55% 左右, 与在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中的报道基本相符。

早在 1991 年, Parselt 等^[15]在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中首次发现 Hsp104 是一类高度保守的定位于细胞质的 Hsp100/ClpB 家族成员蛋白, 并且该蛋白在 N 端和 C 端各有一个 AAA⁺-ATPase

功能域。同时, 在 1993 年, Leonhardt 等^[16]发现在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中 Hsp78 是一类位于线粒体基质中的可溶性 Hsp100/ClpB 蛋白, 并与 Hsp104 相似, 具有 2 个 AAA⁺-ATPase 功能域。这些研究结果随后在高等动物、植物和昆虫中均得到证实, 并发现 2 个蛋白均主要由 α 螺旋组成^[17]。本研究通过 Smart 和 Swiss Model 研究发现, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 主要由 α 螺旋组成, 其中 *IcHsp104* 含有 2 个 AAA⁺-ATPase、2 个 Clp 功能域, 而 *IcHsp78* 含有 2 个 AAA⁺-ATPase 和 1 个 Clp 功能域, 研究结果均与上述在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 的报道相符。综上, 本研究克隆获得的 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 为 2 个经典的环链棒束孢 Hsp100/ClpB 家族基因。

环链棒束孢作为茶园病原真菌群落的优势种, 对茶园多种害虫具有较好的杀虫活性, 然而在施用过程中易受到田间的多种逆境胁迫。如颜鹏等^[18]报道了我国茶园土壤的酸化程度越来越严重, 全国茶园土壤的平均 pH 值已降到了 4.73; 高万君等^[19]报道了我国茶园土壤的草甘膦和草铵膦等农药的残留也较严重; 茶树分布于不同的海拔高度, 各茶园之间的光照、温度和湿度等环境因子存在较大的差异^[20]。以上因素均会影响环链棒束孢对茶园害虫的杀虫活性。因此, 本研究选取了不同温度及盐浓度作为胁迫因子, 检测对 *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 表达的影响。

不同温度处理环链棒束孢结果显示, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 的表达均会被诱导上升, 而且随着时间的延长上升越显著, 但高温处理组显著强于低温处理组。这一研究结果与在其他物种报道的结果相似, 如在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, *AtHsp100* 在常温下几乎检测不到, 但经高温胁迫处理后表达量急剧上升^[21]; 低温胁迫能够诱导草菇 (*Volvariella volvacea*) Hsp100 基因的上调表达^[22]; 不同浓度 NaCl 处理环链棒束孢结果显示, *IcHsp104* 与 *IcHsp78* 在低浓度盐胁迫下

表达被诱导, 而高浓度盐胁迫下表达受到抑制。目前, 虫生真菌 Hsp100/ClpB 与盐胁迫的研究未见报道, 但在其他物种中, 如大豆(Soybean)的 *Hsp100/ClpB* 基因可随着盐浓度的增加而增强表达^[23], 低盐度胁迫可诱导菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) *Hsp100/ClpB* 基因的高表达^[24]。本研究中, 链棒束孢 *Ichsp104* 与 *Ichsp78* 在不同温度及盐浓度胁迫下的表达结果与上述研究结果相似。

综上所述, 本研究克隆并验证了环链棒束孢 Hsp100/ClpB 家族的 2 个基因, *Ichsp104* 与 *Ichsp78* 这 2 个基因均不同程度地参与了温度及盐胁迫的响应, 而且为同步上调或下降。然而该对基因在抵抗逆境胁迫过程中哪个发挥更为重要的作用, 后续仍需做进一步验证。本研究对后续环链棒束孢应对环境胁迫的机理研究及靶标基因改造提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] Li HL, Lin NQ, Guo JX, Wang SJ, Wang QS, Zeng MS, Wu GY. Effects on small green leafhopper and its natural enemy mymarid in tea plantations with intercropping of green manure plants[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(1): 50-54 (in Chinese)
李慧玲, 林乃钤, 郭剑雄, 王水金, 王庆森, 曾明森, 吴光远. 茶园间作绿肥对假眼小绿叶蝉及其天敌缨小蜂的影响[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(1): 50-54
- [2] Li LD, Wang DF, Liu FJ, Li HL, Zhang H, Wu GY. cDNA cloning, preparation of polyclonal antibody and subcellular localization of aquaporin 1 (AQP1) in *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2016, 59(4): 382-391 (in Chinese)
李良德, 王定锋, 刘丰静, 李慧玲, 张辉, 吴光远. 茶尺蠖水通道蛋白 EoAQP1 的 cDNA 克隆、多克隆抗体制备及亚细胞定位[J]. 昆虫学报, 2016, 59(4): 382-391
- [3] Chen LL, Chen P, Wang Y, Ma X, Lin JK, Zhao ZH. Cover crops mediate abundance and egg density of tea green leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) in a tea plantation[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(5): 989-996 (in Chinese)
陈李林, 陈平, 王优, 马旭, 林金科, 赵紫华. 茶园间作功能植物对茶小绿叶蝉的调控作用[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 989-996
- [4] Zhan MK, He LM, Chen M, Wang B, Li ZZ. Screening for a highly virulent entomogenous fungal strain to *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) and its field efficacy[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 41-46 (in Chinese)
展茂魁, 何玲敏, 陈名, 王滨, 李增智. 防治假眼小绿叶蝉的虫生真菌高毒菌株的筛选及田间防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 41-46
- [5] Wang DF, Yang G, Wang QS, Zeng MS, Wu GY. Identification of two *Isaria* isolates and bioassay of their pathogenicity against tea tortrix *Homona coffearia* and smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2014, 41(5): 531-539 (in Chinese)
王定锋, 杨广, 王庆森, 曾明森, 吴光远. 两株棒束孢菌的鉴定及其对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾的致病力[J]. 植物保护学报, 2014, 41(5): 531-539
- [6] Wang DF, Li LD, Wu GY, Vasseur L, Yang G, Huang PR. *De novo* transcriptome sequencing of *Isaria catenianulata* and comparative analysis of gene expression in response to heat and cold stresses[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186040
- [7] Apoorva S, Ramaswamy K. Compatibility of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) with few pyrethroid and organophosphate pesticides[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2013, 7(1): 721-726
- [8] Fernández-Bravo M, Garrido-Jurado I, Valverde-García P, Enkerli J, Quesada-Moraga E. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 141: 6-17
- [9] Ritossa FM. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*[J]. Experimental Cell Research, 1962, 18: 571-573
- [10] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631-677
- [11] Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW. Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes[J]. Cancer Research, 1987, 47(20): 5249-5255
- [12] Liu DL, Zhang XX, Cheng YX, Takano T, Liu SK. *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(5/6): 380-386
- [13] Dal Piaz F, Terracciano S, De Tommasi N, Braca A. Hsp90 activity modulation by plant secondary metabolites[J]. Planta Medica, 2015, 81(14): 1223-1239
- [14] Lindquist S, Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(11): 5301-5306
- [15] Parsell DA, Sanchez Y, Stitzel JD, Lindquist S. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-

- binding sites[J]. *Nature*, 1991, 353(6341): 270-273
- [16] Leonhardt SA, Fearson K, Danese PN, Mason TL. *Hsp78* encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-Dependent proteases[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(10): 6304-6313
- [17] Krzewska J, Langer T, Liberek K. Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding[J]. *FEBS Letters*, 2001, 489(1): 92-96
- [18] Yan P, Han WY, Li X, Zhang LP, Zhang L. Present situation and analysis of soil acidification in Chinese tea garden[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(4): 795-801 (in Chinese)
颜鹏, 韩文炎, 李鑫, 张丽平, 张兰. 中国茶园土壤酸化现状与分析[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(4): 795-801
- [19] Gao WJ, Zhang YZ, Tong MM, Ma HQ, Qian SS, Wang TY, Li YY, Wu HP, Hou RY. Weeds control effect and residues of several herbicides in tea gardens[J]. *Journal of Tea Science*, 2019, 39(5): 587-594 (in Chinese)
高万君, 张永志, 童蒙蒙, 马慧勤, 钱珊珊, 王天雨, 李叶云, 吴慧平, 侯如燕. 茶园常用除草剂田间药效试验与残留动态[J]. *茶叶科学*, 2019, 39(5): 587-594
- [20] Cheng DM, Zhang L, Wei HF, Jiang XF, Zhou SX, Zhang ZY, Peng YS. Different photosynthetic responses of *Camellia sinensis* to Lushan altitude gradient[J]. *Journal of Tea Science*, 2019, 39(4): 447-454 (in Chinese)
程冬梅, 张丽, 韦红飞, 江新风, 周赛霞, 张志勇, 彭焱松. 庐山不同海拔茶树光合响应差异研究[J]. *茶叶科学*, 2019, 39(4): 447-454
- [21] Xu ST, Sun WX, Tian JP, Wang CY. Plant heat shock protein HSP100/ClpB and its applications in improvement of heat and cold resistances in plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 2008, 44(4): 804-810 (in Chinese)
许声涛, 孙文香, 田进平, 王崇英. 植物热激蛋白 HSP100/ClpB 及其在提高植物抗热性和抗寒性中的应用[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(4): 804-810
- [22] 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)
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
- [23] Yang QH, Zhang JX, Dong DK, Yang XD, Jin HX, Chen F, Zhu DH. Overexpression of *OsHsp90* and *BsCspB* genes can enhance salt tolerance of soybean[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(24): 8108-8114 (in Chinese)
杨清华, 张金霞, 董德坤, 杨向东, 金杭霞, 陈芬, 朱丹华. 过表达 *OsHsp90* 和 *BsCspB* 基因可增强大豆的耐盐性[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(24): 8108-8114
- [24] Liu LH. Identification and characterization of heat shock protein 70 gene from Manila clam *Ruditapes philippinarum*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2015 (in Chinese)
刘连会. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)热休克蛋白 70 基因的克隆及表达分析[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2015