

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.23054

热诱导转录因子 ZmNF-YC13 调控热胁迫应答基因提高玉米耐热性

梅秀鹏^{1,2,**} 赵子堃^{1,2,**} 贾欣瑶^{1,2} 白 洋^{1,2} 李 梅³ 甘宇玲^{1,2}
杨秋悦^{1,2} 蔡一林^{1,2,*}

¹ 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715; ² 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715; ³ 广西农业职业技术大学农学与园艺系, 广西南宁 530007

摘 要: 热胁迫是影响玉米生长发育和产量形成的重要因素, 相关抗性基因的挖掘和机制解析是进行玉米耐热品种培育的重要分子基础, 而目前这方面的研究仍是缺乏。本研究鉴定到一个与热胁迫应答相关的核因子 ZmNF-YC13, 该基因受高温和渗透胁迫快速诱导表达。用拟南芥热胁迫诱导表达基因 *AtHSP70* 的启动子驱动 *ZmNF-YC13* 基因, 转化玉米筛选出了热诱导表达的转基因材料 HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc。高温处理后的表型鉴定表明, 叶长、叶宽、地上部粗、地上部分和地下部分的鲜重和干重均显著高于野生型。表达分析表明, ZmNF-YC13 能增强下游热胁迫应答基因响应热胁迫的程度。荧光素酶报告基因实验和 ChIP-qPCR 实验表明, ZmNF-YC13 可调控热应激转录因子 *ZmHsfA2c* 的表达。这些结果初步证实了 ZmNF-YC13 可通过调控下游热胁迫应答基因来提高玉米的耐热能力, 可为利用该位点的多态性进行分子标记辅助选择和种质资源鉴定提供理论依据。

关键词: 玉米; 热胁迫; 热应激转录因子; NF-Y

Heat-inducible transcription factor ZmNF-YC13 regulates heat stress response genes to improve heat tolerance in maize

MEI Xiu-Peng^{1,2,**}, ZHAO Zi-Kun^{1,2,**}, JIA Xin-Yao^{1,2}, BAI Yang^{1,2}, LI Mei³, GAN Yu-Ling^{1,2}, YANG Qiu-Yue^{1,2}, and CAI Yi-Lin^{1,2,*}

¹ College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400715, China; ³ Department of Agriculture and Horticulture, Guangxi Agricultural Vocational University, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: Heat stress is an essential factor affecting maize growth and yield formation. The exploration and mechanism analysis of related tolerance genes is an important field for breeding maize heat stress tolerant varieties. However, there is few study in this aspect. In this study, we identified a nuclear factor ZmNF-YC13 associated with heat stress response, and its encoding gene expression was rapidly induced by high temperature and osmotic stress. The promoter of *Arabidopsis thaliana* heat stress-inducible expression gene *AtHSP70* was used to drive *ZmNF-YC13* and the heat-inducible expression maize material of *ZmNF-YC13* (HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc) was successfully screened. Phenotypic analysis after high temperature treatment demonstrated that leaf length, leaf width, shoot thickness, fresh and dry weight of shoot and root were significantly higher than wild type. The relative expression level showed that ZmNF-YC13 could enhance the inducible level of downstream heat stress response genes in response to heat stress. Luciferase reporter assay and ChIP-qPCR assay also revealed that ZmNF-YC13 could regulate the

本研究由国家自然科学基金项目(31901555), 中国博士后科学基金项目(2019M663879XB)和西南大学大学生创新创业训练计划项目(S202210635315)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901555), the China Postdoctoral Science Foundation (2019M663879XB), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Southwest University (S202210635315).

* 通信作者(Corresponding author): 蔡一林, E-mail: caiyilin1789@163.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 梅秀鹏, E-mail: swumxp2009@163.com; 赵子堃, E-mail: 404683331@qq.com

Received (收稿日期): 2022-08-03; Accepted (接受日期): 2022-11-25; Published online (网络出版日期): 2022-12-05.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20221202.1545.006.html>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

expression of heat stress transcription factor ZmHsfA2c. These results confirmed preliminarily that ZmNF-YC13 could improve the heat tolerance of maize by regulating downstream heat stress response genes, which could provide a theoretical basis for marker-assisted selection and germplasm identification using the polymorphism of this locus.

Keywords: maize; heat stress; heat stress transcription factor; NF-Y

非生物胁迫是环境因素中对农作物影响最为广泛的胁迫因子^[1-2]。统计数据表明, 1964—2007 年间全球作物(水稻、玉米和小麦)产量因高温和干旱导致的损失高达 9%~10%^[1], 在某些区域损失更高^[3]。其中, 热胁迫(heat stress)能影响作物的多个生理生化过程, 如高温条件下玉米胚芽鞘的生长发育减缓^[4], 叶片光合效率降低, 玉米雄穗分枝以及雌花小花密度明显减少, 籽粒产量降低^[5-6], 以及玉米籽粒中淀粉、蛋白质和油脂等成分的含量下降等^[7]。

为应对热胁迫, 植物形成了一系列的调控机制^[8]。研究表明, 一些转录因子和功能蛋白在热胁迫应答中发挥了重要作用。其中最为重要的一类就是热激转录因子(heat shock transcription factor, Hsf)。如 HsfA1s 在热胁迫应答过程中扮演“主要调节因子”的角色, 在整个转录调控网络的激活过程中具有不可替代的作用^[8]。在番茄和拟南芥中的研究表明, HsfA1s 编码基因的单突变或多突变均能引起植株的热敏感表型和大量热胁迫响应基因表达水平的下降^[9-11]。而且, HsfA1s 还直接参与调节一些编码重要热胁迫应答转录因子的基因, 例如脱水响应元件结合蛋白 *Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2A* (*DREB2A*)、*HsfA2*、*HsfA7a*、*HsfBs* 和多肽桥连因子 *Multiprotein bridging factor 1C* (*MBF1C*)等^[9]。热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)是由热胁迫诱导产生的主要功能蛋白, 其编码基因也是热胁迫应答转录因子调控的重要靶基因之一, 同时在由热胁迫导致的变性蛋白重折叠的质量控制过程中也发挥重要作用^[12-13]。如 HSP21 蛋白是拟南芥在热胁迫条件下叶绿体正常发育所必需的^[14]。过表达水稻 *HsfA2e* 和拟南芥 *HsfA2* 基因均能够上调 HSPs 相关编码基因的表达, 并且增强植株的耐热性^[15-16]; 相反, *HsfA2* 突变后增强了植株对热胁迫的敏感性, 并且下调了许多与热胁迫应答相关基因的表达^[17]; 此外, *HsfA2* 在维持 HSP 编码基因的表达和延长植株获得性耐热能力的持续时间方面还具有重要作用^[17]。

CCAAT Binding Factor/Nuclear Factor of the Y Box (CBF/NF-Y)是一类存在于真核生物中的调控因子^[18], 由 NF-YA (HAP2/CBF-B)、NF-YB (HAP3/

CBF-A)和 NF-YC (HAP5/CBF-C) 3 个亚家族组成。通常是以 NF-YA、NF-YB 和 NF-YC 三个亚基组成的异源三聚体或 NF-Y 复合体与其他转录因子互作的形式调控下游基因的表达^[19]。已有研究表明, NF-Y 转录因子在调控植物的生长发育过程中具有重要作用, 如参与种子发育、开花期调控和逆境应答调控等过程^[19-22]。近些年, 在主要农作物(玉米、水稻、小麦等)中一些 NF-Y 编码基因在抗逆性方面的功能也不断得到解析。例如, 玉米中过表达 *ZmNF-YB2* 基因后, 转基因植株的抗旱能力显著增强, 而且在缺水条件下能显著提高植株产量^[23]; 过表达玉米 *ZmNF-YB16* 基因能够增强植株的光合能力和抗氧化能力, 进而提高植株的产量和抗旱能力^[24]。在良好的灌溉条件下, 过表达 *TaNF-YB4* 基因能显著增加小麦的穗数, 提高 20%~30%的籽粒产量^[25]。在水稻中, *OsNF-YA10* 基因突变后可以增强水稻植株的耐旱性^[26]; *OsNF-YA7* 基因受干旱胁迫诱导表达, 并通过非 ABA 依赖途径参与干旱逆境的响应^[27]; 以及 NF-YB2 通过调控 *Late Embryogenesis Abundant 7* (*LEA7*)和 *LEA76* 基因增强植株的耐旱能力, NF-YB3 通过调控 *HSEF3* 和 *HSP70B* 基因提高植株对高温的耐受能力等^[28]。在 NF-YC 编码基因中, 过表达 *OsNF-YC4* 能促进高温、干旱应答基因 (*OsHSP23.7*、*OsLEA3*、*OsRAB21* 等)的表达, 从而提高植株对高温干旱的抗性^[29]。此外, 拟南芥 AtNF-YC1 (AtHAP5A)通过调控 *Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase 21* (*AtXTH21*)影响植株对冷胁迫的耐受能力, 过表达 *AtNF-YC1* 基因可显著提高植株对冷胁迫的抗性^[30]。AtNF-YC10、AtNF-YA2、AtNF-YB3 和 *DREB2A* 形成 NF-Y-DREB2A 复合物共同参与植株对热胁迫的调控, 在拟南芥和水稻中过表达 *AtNF-YC10* 均能显著提高植株对高温的耐受性^[31-32]。这些研究结果均体现了 NF-Y 核因子在作物中的潜在应用价值。然而, 在玉米中关于 NF-YC 亚家族编码基因参与热胁迫应答调控的研究报道仍是缺乏。

实验室前期研究表明 *ZmNF-YC13* 基因受内质网胁迫诱导表达, 在玉米中超表达 *ZmNF-YC13* 可提高植株对内质网胁迫的耐受性^[33]。本研究表明

ZmNF-YC13 还受热胁迫和渗透胁迫快速诱导表达, 通过热诱导表达启动子驱动 *ZmNF-YC13* 基因可显著提高植株对高温的耐受性; 表达分析等表明 *ZmNF-YC13* 在高温条件下可能是通过增强热胁迫应答基因的表达来提高植株的耐热能力。本研究不仅丰富了 NF-YC 转录因子在热胁迫应答通路中的调控模式, 也为利用该位点进行耐热性辅助选择和种质资源鉴定提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 非生物胁迫处理及表达分析

实验室苗期玉米材料均播于 Pindstrup 基质中, 置于光照培养箱(PERCIVAL, 美国)培养, 参数设置为温度 28℃/25℃, 光周期 16 h/8 h, 光照强度 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 湿度 40%~60%。对 *ZmNF-YC13* 基因在高温处理下的表达模式进行分析时, 转基因受体材料播种后第 10 天, 保留长势一致的植株并提前一天浇足水, 将培养箱温度调为 45℃, 光照强度 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 分别在 0、0.5、1、2 和 5 h 取第 2 叶相同部位组织, 液氮速冻后于超低温冰箱保存待用。对 *ZmNF-YC13* 基因在渗透胁迫处理下的表达模式进行分析时, 播种后第 10 d, 保留长势一致的植株, 用 10%的 PEG-6000 溶液彻底浇透, 分别在 0、0.5、1、2 和 5 h 取第 2 叶相同部位组织, 液氮速冻后于超低温冰箱保存待用。利用热敏感和耐热自交系进行表达分析时, 在播种后 10 d, 保留长势一致的植株并提前一天浇足水, 将培养箱温度调为 45℃, 光照强度 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 分别在 0 h 和 0.5 h 取第 2 叶相同部位组织, 液氮速冻后于超低温冰箱保存待用。

玉米叶片总 RNA 采用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAprep pure Plant Kit 提取, cDNA 第一链合成采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, 美国)进行。荧光定量 PCR 仪 CFX96 Touch Cycloer System (Bio-Rad, Hercules, 美国)和荧光染料 SYBR Premix Ex Taq II (Takara Biomedical Technology, 中国北京)用于 qRT-PCR 检测。每个样品设置 3 个技术重复, *18S rRNA* 用作内参基因, 利用比较 C_T 值法进行计算相对表达量(引物序列见附表 1)。

1.2 玉米遗传转化及阳性鉴定

首先从拟南芥基因组中克隆热诱导表达基因 *AtHSP21* 起始密码子上游 2 kb 序列(HSP21Pro)^[14],

利用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*HI 对已构建完成的载体 pCambia3301-Ubi:ZmNF-YC13-myc 进行线性化(同时去掉 Ubi 启动子序列)^[34], 再借助重组连接酶 ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme, 中国南京)完成 HSP21Pro 序列和 pCambia3301-ZmNF-YC13-myc 线性质粒的连接, 形成 pCambia3301-HSP21 Pro:ZmNF-YC13-myc 环状质粒。最后将经测序分析确认正确的质粒转入农杆菌 EHA105 中, 保存备用。玉米遗传转化采用农杆菌介导浸染玉米未成熟幼胚的方法进行^[35], 草铵膦(5 $\mu\text{g L}^{-1}$)用于组织培养过程中的阳性植株筛选。 T_3 代纯合植株在高温处理不同时间段的叶片总蛋白用于 Western blot 检测 ZmNF-YC13-myc 融合蛋白的表达情况。

1.3 荧光素酶报告基因试验

对于荧光素酶报告基因实验, *ZmNF-YC13* 编码序列用于构建 35S:ZmNF-YC13 (干扰质粒)载体, *ZmHsfA2c* 起始密码子上游 1 kb 序列用于构建 pGreenII 0800-ZmHsfA2cPro:LUC (报告质粒)载体(引物序列见附表 1), 载体序列连接均用 ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme, 中国南京)完成。玉米叶片原生质体分离、提取和瞬时转化参照 Mei 等^[34]描述方法完成, 质粒提取用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒进行, 原生质体瞬时转化采用 PEG- Ca^{2+} 介导转化法进行。细胞培养结束后, (1) 将细胞转移至 1.5 mL 离心管中, 110×g, 2 min, 去上清; (2) 加入 100 μL Lysis buffer 至收集有原生质体的离心管中, 充分涡旋混匀; (3) 冰浴 5 min, 16,260×g, 30 s; (4) 根据 Dual Luciferase Reporter Assay System 试剂盒(Promega, 美国)说明书分别测定萤火虫荧光素酶活性值(LUC)和海肾荧光素酶活性值(REN)。

1.4 玉米苗期高温处理及表型分析

选择籽粒大小接近的野生型和 *ZmNF-YC13* 热诱导表达材料玉米种子播于 Pindstrup 基质中, 置于光照培养箱(PERCIVAL, 美国)培养, 温度 28℃/25℃, 光周期 16 h/8 h, 光照强度 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 湿度 40%~60%。播种后第 10 天, 保留长势一致的植株并提前一天浇足水, 将培养箱温度调为 45℃, 光照强度 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 继续培养 8 h。处理结束后将培养箱参数调至正常模式继续培养 15 d, 培养过程中适时补充水分和营养。恢复培养结束后, 分别测量第 5 叶和第 6 叶(心叶)长、第 5 叶宽、地上部粗

(地下与地上连接处以上 1 cm 位置, 用游标卡尺测量)和地上部分、地下部分鲜重。测干重前, 先用 110℃ 烘 6 h, 再用 80℃ 烘干至恒重。

1.5 热诱导表达材料 Western blot 检测

对 *ZmNF-YC13* 热诱导表达材料在高温处理下的表达情况进行检测时, T_3 代纯合转基因材料播种后第 10 天, 保留长势一致的植株并提前一天浇足水, 将培养箱温度调为 45℃, 光照强度 $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 分别在 0、0.5、1、2、5、12、24、36 和 48 h 取植株相同部位叶片, 快速称量 1 g 组织于液氮速冻后放入超低温冰箱保存待用。提取总蛋白时, 液氮充分研磨组织后, 加入 1 mL 预冷蛋白提取液(50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} EDTA, 150 mmol L^{-1} NaCl, 10% Glycerol, 1 mmol L^{-1} PMSF), 轻柔混匀后, 置于 4℃ 冰箱, 颠倒摇 30 min; 随后 4℃, 16,260×g, 30 min, 收集上清即为蛋白溶液。变性凝胶电泳采用 Bio-Rad 电泳仪和蛋白电泳槽进行, 转膜采用 Bio-Rad Transblot SD 半干转系统(Bio-Rad, Hercules, 美国)进行。一抗 1:2000 稀释, 二抗 1:5000 稀释, WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR, 美国)用于显影, C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, 美国)用于照相。所有操作步骤参照 Mei 等描述方法完成^[33-34]。

1.6 下游基因表达特点分析

分析下游基因在高温处理下的表达特点时, 野生型和 *ZmNF-YC13* 热诱导表达材料培养和高温处理以及总 RNA 提取、反转录、和 qRT-PCR 检测均参照 1.1 中的实验方案进行。

1.7 染色质免疫共沉淀

将生长 14 d 的 HSP21Pro:*ZmNF-YC13*-myc 植株叶片(45℃处理 2 h 后)切成 0.5~1.0 cm 条状, 然后放入含 1%甲醛的固定液中, 冰上真空(0.08 MPa)交联 10 min 后, 加入甘氨酸(终浓度为 0.125 mol L^{-1}), 再真空渗透 10 min, 停止交联, ddH₂O 冲洗 3 次, 用滤纸快速吸干材料表面液体后放入液氮速冻。组织均一化和细胞核提取参照 Cold Spring Harbor 方法进行^[36]。琼脂糖磁珠 Binding control 用于细胞裂解液预清除, GFP-Trap 琼脂糖磁珠和 Myc-Trap 琼脂糖磁珠(ChromoTek GmbH, 德国)用于免疫沉淀。QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 德国)用于纯化回收 input 和沉淀后 DNA。qPCR 检测分析后以 GFP-Trap 作为对照进行计算富集度, 分别进行 3 次独立实验(引物序列见附表 1)。

2 结果与分析

2.1 *ZmNF-YC13* 表达特点分析及热诱导表达材料创制

在实验室前期研究中, 筛选出了响应内质网胁迫应答调控因子 *ZmNF-YC13*, 并证实该基因在玉米内质网胁迫应答调控过程中具有重要作用^[33]。进一步对该基因在其他非生物胁迫条件下的分析表明, *ZmNF-YC13* 基因的表达受到渗透胁迫和高温的快速诱导, 随后下降(图 1-A)。为进一步分析 *ZmNF-YC13* 基因表达量与玉米耐热性的关系, 我们选取了在耐热能力上具有极端差异(耐热型和热敏感型)的玉米自交系, 并于高温胁迫处理前后分别检测了 *ZmNF-YC13* 基因的表达量。结果表明, 在正常条件下, 耐热型自交系材料中 *ZmNF-YC13* 基因的表达量均高于热敏感型自交系材料(图 1-B)。45℃ 高温处理 1 h 后, *ZmNF-YC13* 基因在各自交系材料中出现了不同程度的响应, 在耐热型自交系材料中上调水平更高, 且该基因整体的表达水平高于热敏感型自交系材料(图 1-C)。上述结果说明, *ZmNF-YC13* 基因可能参与玉米热胁迫应答调控过程。

组成型表达 *ZmNF-YC13* 虽在一定程度上提高玉米植株对非生物胁迫的抗性, 但过高的 *ZmNF-YC13* 基因表达量同时也会抑制植株的生长^[34]。为避免提高 *ZmNF-YC13* 基因表达量对植株生长带来的迟缓效应, 我们克隆了拟南芥热诱导表达基因 *AtHSP21* 基因启动子, 构建了利用该启动子表达 *ZmNF-YC13* 基因的玉米转基因材料(HSP21Pro:*ZmNF-YC13*-myc)。随后我们在高温处理前以及高温处理后不同时间段利用 anti-myc 抗体在蛋白水平上对 T_3 代纯合材料 HSP21Pro:*ZmNF-YC13*-myc 检测表明, 在正常培养条件下(0 h), *ZmNF-YC13*-myc 融合蛋白的表达量较低; 受到 45℃ 高温处理后, *ZmNF-YC13*-myc 的蛋白水平快速积累。该结果表明成功构建了 *ZmNF-YC13* 基因的热诱导表达玉米材料(图 1-D)。

2.2 热诱导表达 *ZmNF-YC13* 基因提高玉米苗期植株的耐热能力

我们进一步对通过热诱导表达 *ZmNF-YC13* 基因是否能够提高玉米苗期植株的耐热能力进行了分析。在正常培养条件下, 野生型植株与 *ZmNF-YC13* 热诱导表达植株的长势无显著差异(图 2-A)。在经过 45℃ 高温胁迫处理 8 h 后, 野生型植株和 *ZmNF-*

YC13 热诱导表达植株的叶片均出现了不同程度的卷曲和萎蔫现象(图 2-B)。将处理后的植株在正常条件下恢复培养 15 d 后, *ZmNF-YC13* 热诱导表达植株的长势均优于野生型的植株(图 2-C)。同时, 我们对野

生型植株和 *ZmNF-YC13* 热诱导表达植株正常培养条件下和在高温处理后的生物量进行了测定。结果表明, 在高温处理之后, *ZmNF-YC13* 热诱导表达植株的地上部和地下部的鲜重和干重均显著高于野生型植

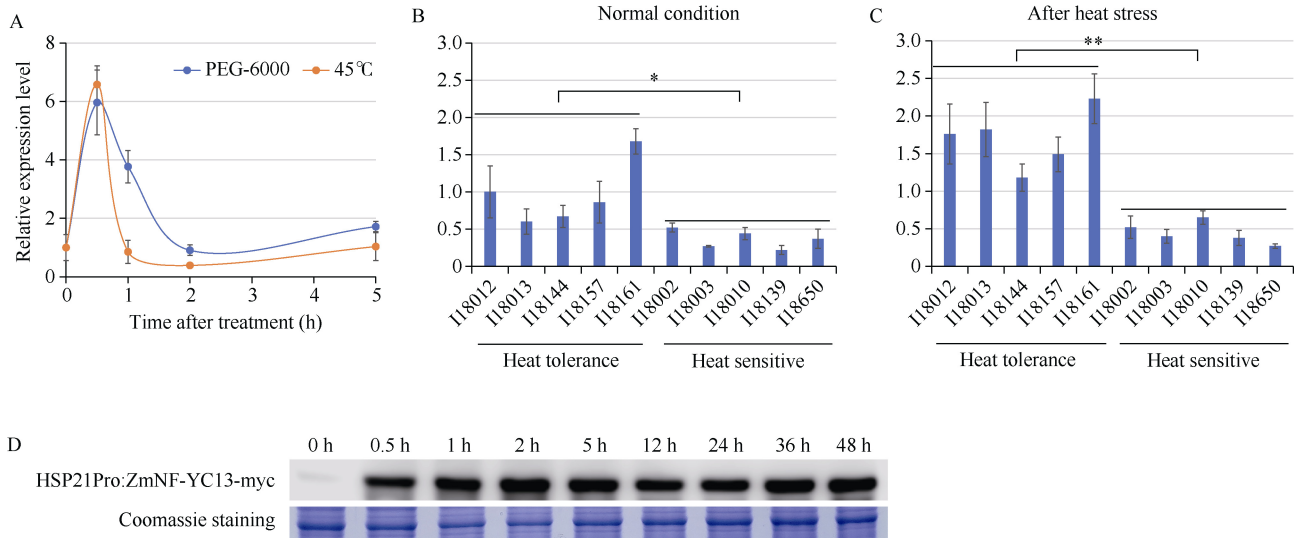
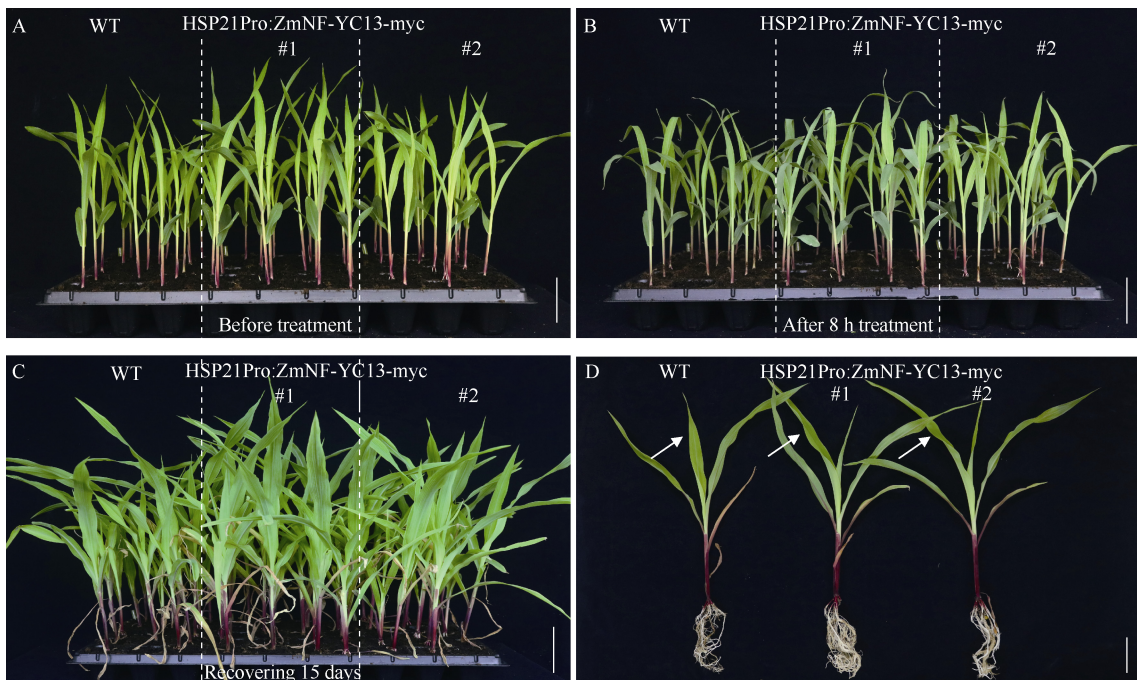


图 1 *ZmNF-YC13* 在不同条件和材料中的表达分析

Fig. 1 Relative expression level of *ZmNF-YC13* under different conditions and inbred lines in maize

A: 高温和渗透胁迫处理条件下 *ZmNF-YC13* 基因叶片中的表达特点分析; B: 正常生长条件下耐热型和热敏感型玉米自交系植株叶片中 *ZmNF-YC13* 基因表达量分析; C: 高温胁迫处理后耐热型和热敏感型玉米自交系植株中 *ZmNF-YC13* 基因表达量分析; 每组试验均采用 3 次生物学重复, 数据显著性分析采用 Student's *t* 测验(双尾), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; D: HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc 植株在高温处理下 *ZmNF-YC13*-myc 融合蛋白检测。

A: relative expression level of *ZmNF-YC13* genes in maize leaves under heat stress and osmotic conditions. B: *ZmNF-YC13* gene expression in heat-tolerant and heat-sensitive maize inbred plants leaves under normal condition. C: *ZmNF-YC13* gene expression in heat-tolerant and heat-sensitive maize inbred plants leaves after heat stress. Data are means of three biological replicates. Differences among data were tested using two-tailed Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. D: ZmNF-YC13-myc fused protein analysis of the HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc plants leaves under heat stress by Western blot.



(图 2)

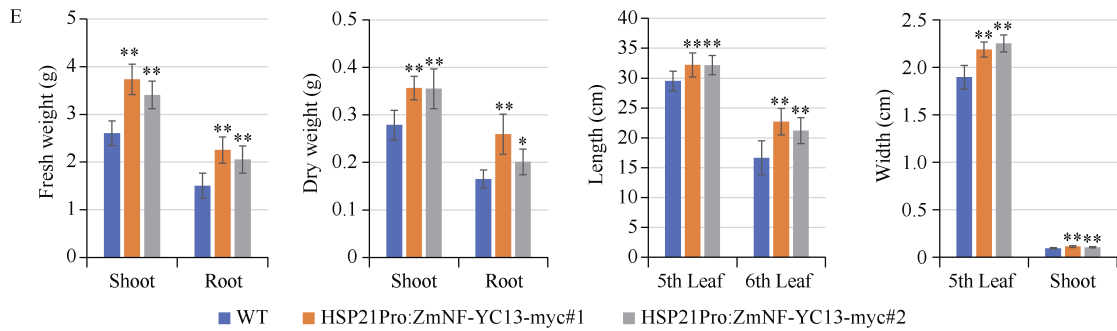


图 2 野生型与 *ZmNF-YC13* 热诱导表达材料在高温处理后的表型分析

Fig. 2 Phenotypic analysis of wild-type (WT) and HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc plants under heat stress

A~D: 野生型和 *ZmNF-YC13* 诱导材料在正常条件和高温处理后的植株长势形态, D 图中箭头指示为第 5 叶, 比例尺为 5 cm; E: 高温处理后野生型和 *ZmNF-YC13* 热诱导材料叶长、叶宽、地上部粗、地上部分和地下部分的鲜重和干重统计; 显著性分析采用 Student's *t* 测验(双尾), $n > 20$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

A~D: Plant morphologies of wild-type (WT) and HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc plants before and after high temperature treatment. The arrow in Fig. 2-D indicates the fifth leaf, Bar: 5 cm. E: leaf length, leaf width, shoot thickness, and biomass of the wild-type (WT) and HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc plants after high temperature treatment. Data are means of three biological replicates. Differences among data were tested using two-tailed Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

株; 第 6 叶、第 5 叶长度和宽度以及地上部粗度(地下部和地上部连接处以上 1 cm 位置)均显著高于野生型植株(图 2-D, E)。以上结果说明, 热诱导表达 *ZmNF-YC13* 基因能够提高玉米苗期植株的耐热能力。

2.3 *ZmNF-YC13* 调控热胁迫诱导表达基因的表达

由于高温胁迫是自然条件下引起内质网胁迫的主要因素之一^[37]。因此我们猜测 *ZmNF-YC13* 在内质网胁迫应答通路中调控的下游基因(*ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2*、*ZmHSP70* 和 *ZmHsfA2c* 等)可能同样参与了热胁迫应答调控^[33,38]。为证实这一猜测, 我们首先

对受 *ZmNF-YC13* 调控的下游基因在高温处理下的表达特点进行了分析。结果表明, 在 45℃ 高温处理下, 野生型玉米植株中 *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2*、*ZmHSP70* 和 *ZmHsfA2c* 基因的表达量快速增加, 且在 1 h 左右达到高峰, 说明 *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2*、*ZmHSP70* 和 *ZmHsfA2c* 基因是热胁迫应答基因。在 *ZmNF-YC13* 热诱导表达材料中, *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2*、*ZmHSP70* 和 *ZmHsfA2c* 基因受高温诱导表达的程度较野生型植株明显提高, 表明提高 *ZmNF-YC13* 基因表达量能增强热胁迫诱导表达基因的表达(图 3)。

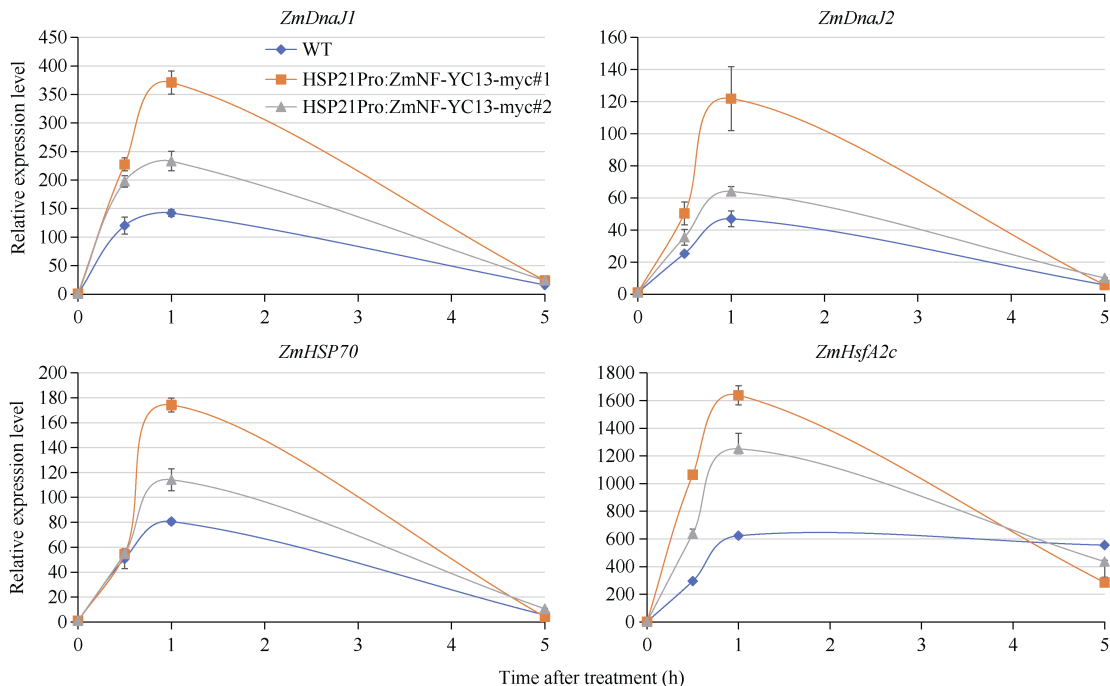


图 3 高温胁迫应答基因在野生型材料和 *ZmNF-YC13* 热诱导材料中的表达模式分析

Fig. 3 Relative expression patterns of heat stress responsive genes in wild-type and HSP21Pro:ZmNF-YC13-myc plants

2.4 ZmNF-YC13 调控 *ZmHsfA2c* 基因表达

由于热应激转录因子在植物热胁迫应答调控中具有重要作用, 且 Gu 等研究表明在拟南芥中超表达 *HSEF2* (*ZmHsfA2c*) 可提高植株耐热能力^[39], 而在本研究中发现 *ZmHsfA2c* 的表达量受 ZmNF-YC13 的调控。为了进一步证实 ZmNF-YC13-ZmHsfA2c 这一调控通路, 我们利用荧光素酶报告基因实验和 ChIP-qPCR 进一步进行了分析。荧光素酶报告基因实验结果表明, ZmNF-YC13 蛋白可显著激活

ZmHsfA2c 基因的启动子(图 4-A)。利用染色质免疫共沉淀并结合 qPCR 的方法对 *ZmHsfA2c* 基因起始密码子 ATG 上游 1 kb 范围的启动子区域分析表明, 目标蛋白在 *ZmHsfA2c* 基因的启动子区段 2 和区段 3 上有较高的富集峰(图 4-B)。我们进一步对启动子区段 2 和区段 3 的序列分析发现, 在区段中存在两个典型的热胁迫应答元件(heat shock element, HSE)(图 4-C)。以上结果表明, ZmNF-YC13 能够调控 *ZmHsfA2c* 基因表达, 可能依赖于热胁迫应答元件。

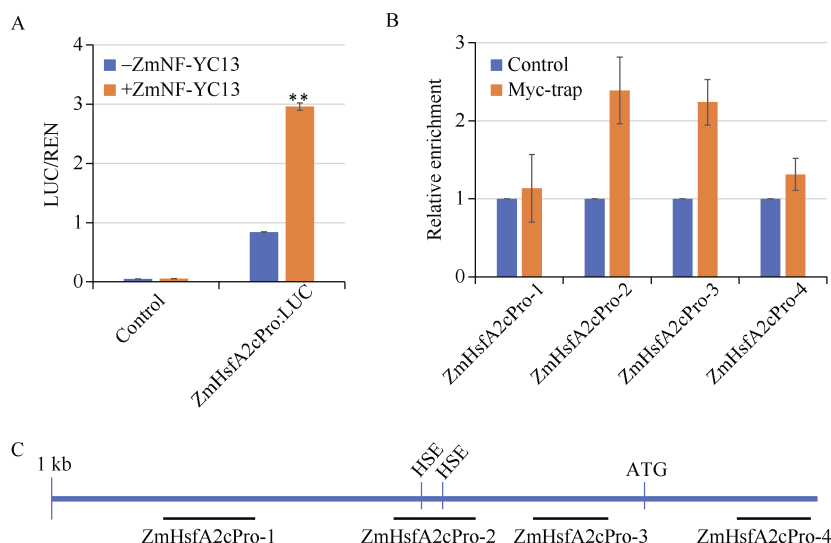


图 4 ZmNF-YC13 调控 *ZmHsfA2c* 基因表达

Fig. 4 Relative expression levels of *ZmHsfA2c* genes regulated by ZmNF-YC13

A: *ZmHsfA2c* 基因启动子和 ZmNF-YC13 蛋白之间的反式激活效应分析。-ZmNF-YC13 表示不含有 ZmNF-YC13 蛋白(对照), +ZmNF-YC13 表示含有 ZmNF-YC13 蛋白。数据为 3 次独立实验的平均值。**: $P < 0.01$ 。B: *ZmNF-YC13* 基因的启动子结合位点 ChIP-qPCR 分析。数据为 3 次独立实验的平均值。C: 用于 ChIP-qPCR 分析的 *ZmHsfA2c* 启动子片段示意图。

A: the transactivation of *ZmHsfA2c* promoter and ZmNF-YC13. For the transactivation, -ZmNF-YC13 means empty effector plasmid and +ZmNF-YC13 means ZmNF-YC13-fused effector plasmid. Data are means $\pm$ SDs of three independent experiments. **: $P < 0.01$. B: the promoter binding site analysis of *ZmNF-YC13*. The experiment was performed by three independent experiments. C: the schematic diagram of the *ZmHsfA2c* promoter fragments using for ChIP-qPCR analysis.

3 讨论

植物作为一种固着生物, 其生长发育极易受到自然环境的影响, 如高温破坏植物细胞膜系统的稳定性、引起细胞内酶系统紊乱、籽粒过早脱水等, 从而扰乱其正常的生理阶段和进程, 使生长发育和产量形成受到严重影响^[40]。植物在进化过程中从分子、细胞和生理生化层面上也形成了一系列的调节机制, 以应对或缓解环境变化所带来的影响^[41]。如在高温胁迫下, 植物细胞首先感知高温刺激并将信号放大传递至胞内, 进而激活一系列高温胁迫应答基因的表达以此来应对或缓解高温带来的损伤, 这一信号转导机制和转录调控网络在植物响应高温胁迫过程

中至关重要, 而与热胁迫应答相关的转录因子作为调控下游靶基因表达的分子开关, 在这个过程中具有不可替代的作用^[42-43]。

Mei 等^[33-34]研究发现 *ZmNF-YC13* 基因受内质网胁迫(用化学试剂二硫苏糖醇和衣霉素处理)诱导表达, 编码核内蛋白, 且具备一定的转录激活能力; 在玉米中组成型表达 *ZmNF-YC13* 基因后能够提高植株对内质网胁迫的耐受能力^[33]。在自然环境中, 高温是诱导产生内质网胁迫的重要因素^[37]。因此, 本研究中进一步分析了 *ZmNF-YC13* 基因在高温和渗透胁迫下的表达特点。结果表明 *ZmNF-YC13* 基因受高温和渗透胁迫快速诱导表达, 说明 ZmNF-YC13 可能是一个响应热胁迫应答的转录调控因子。

然而提高 *ZmNF-YC13* 基因的表达量虽能提高植株对内质网胁迫的耐受能力,但过高的 *ZmNF-YC13* 表达量同时也抑制植株叶片的生长^[34]。为了能利用提高 *ZmNF-YC13* 基因表达量来增强植株的抗逆性,同时又尽可能消除过高的 *ZmNF-YC13* 表达量带来的不良效应,我们创制了利用拟南芥热胁迫应答基因 *AtHSP70* 的启动子在玉米中驱动 *ZmNF-YC13* 基因表达的转基因玉米材料。高温条件下的表型分析也证实了通过热诱导表达 *ZmNF-YC13* 基因能够增强玉米植株的耐热能力。

热激蛋白是生物体在感知到高温、干旱等不利环境因素时诱导合成的一类结构保守的应激蛋白,是植物短暂适应或应对逆境胁迫不可或缺的成分^[44]。如在玉米、水稻、小麦和甘蔗等中的研究表明, HSP70 热激蛋白受热诱导并在响应热胁迫的过程中发挥重要作用^[44]。DnaJ 蛋白是生物体内重要的分子伴侣类因子^[45],它具有独自或协助 HSP70 完成蛋白质折叠、解折叠、聚合和调节蛋白复合物解聚等功能,是植物在逆境胁迫条件下维持蛋白质或蛋白复合体稳定的重要角色^[46]。如番茄的 DnaJ 蛋白 SICD2 可通过维持较低的蛋白水解酶活性来延缓 Rubisco 的降解速度,从而缓解高温对光合作用的抑制效应^[47]。拟南芥 DnaJ 蛋白 TMS1 通过与未折叠蛋白应答途径的重要因子 BiP1 和 BiP3 蛋白互作来参与未折叠蛋白再折叠和降解的调控过程,进而在花粉管及其他组织耐热性中发挥作用^[48]。在玉米 *ZmNF-YC13* 基因的组成型表达材料中, *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2* 和 *ZmHSP70* 等基因的表达量得到显著上调,表明这些基因可能受 *ZmNF-YC13* 蛋白的调控;荧光素酶报告基因实验进一步证实了 *ZmNF-YC13* 蛋白能够激活 *ZmDnaJ2* 和 *ZmHSP70* 基因的启动子活性^[33]。并且在内质网胁迫条件下, *ZmNF-YC13* 转录因子能够通过调控 *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2* 和 *ZmHSP70* 基因的表达来缓解植株的受胁迫状态^[33]。本研究中的表达分析表明, *ZmDnaJ1*、*ZmDnaJ2* 和 *ZmHSP70* 等基因的表达受热胁迫快速诱导,而且 *ZmNF-YC13* 蛋白能够在高温条件下增强上述基因的表达。

除了热激蛋白及其辅助因子外,热激转录因子是存在于真核生物体内调控热胁迫应答的一类重要转录因子。例如, *HsfA1a* 是番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中热胁迫应答的主要调节因子^[11];在拟南芥中, *HsfA1a* 和 *HsfA1b* 在热胁迫应答早期诱导热激蛋白编码基因的表达中起重要作用^[49]。 *HsfA2* 基

因的表达在番茄^[50]和拟南芥^[51]中受热胁迫强烈诱导,并且 *HsfA2* 在植物长期热胁迫条件下或热胁迫后恢复过程中对 HSP 基因的转录调控起重要作用^[52],也是拟南芥植株保持获得性耐热能力的必需基因^[17]。此外,在拟南芥中超表达玉米 *HsFA2* (*ZmHsfA2c*) 基因能够提高植株的耐热性^[39]。在本研究中,表达分析、荧光素酶报告基因实验以及 ChIP-qPCR 等实验表明 *ZmNF-YC13* 能调控 *ZmHsfA2c* 的表达,说明 *ZmNF-YC13* 在热胁迫应答途径中是一个重要的上游调控子,由此也反应出 *ZmNF-YC13* 可能从多个途径参与了玉米热胁迫应答的调控过程。前人的研究结果中,水稻 *OsNF-YC4* 通过调控 *OsHSP23.7* 等基因提高植株对高温的耐受性^[29],拟南芥 *AtNF-YC10* 以 NF-Y-DREB2A 复合物形式调控 *HSP17.6A*、*HsfA2*、*HsfA3* 和 *HsfA7* 等基因的表达来参与对热胁迫的响应^[31]。本研究结果不仅表明 *ZmNF-YC13* 可通过调控 *HSP70* 和 *HsfA2c* 等基因的表达来响应热胁迫,还揭示了 DnaJ 类分子伴侣因子也是 *ZmNF-YC13* 蛋白调控的重要下游基因。因此,本研究不仅拓展了 NF-YC 转录因子在热胁迫通路中调控的下游基因,同时也证实了植物内质网胁迫应答和植物热胁迫应答在调控通路上存在交叉。

4 结论

本研究结果表明玉米核因子编码基因 *ZmNF-YC13* 受高温和渗透胁迫诱导表达,在玉米中热诱导表达 *ZmNF-YC13* 可提高玉米苗期植株的耐热能力。对野生型和转基因材料在高温条件下的表达分析表明 *ZmNF-YC13* 在热胁迫条件下可增强热胁迫应答基因的表达;荧光素酶报告基因实验和 ChIP-qPCR 实验表明 *ZmNF-YC13* 还能调控热激转录因子编码基因 *ZmHsfA2c* 的表达。因此,本研究结果表明 *ZmNF-YC13* 是玉米响应热胁迫应答过程中的重要调控因子,热诱导表达 *ZmNF-YC13* 可能是通过增强下游热胁迫应答基因的表达来提高植株的耐热能力。

References

- [1] Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 2016, 529: 84–87.
- [2] Lobell D B, Wolfram S, Justin C R. Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 2011, 333: 616–620.
- [3] Fahad S, Bajwa A A, Nazir U, Anjum S A, Farooq A, Zohaib A, Sadia S, Nasim W, Adkins S, Saud S, Ihsan M Z, Alharby H, Wu C, Wang D P, Huang J L. Crop production under drought and heat

- stress: plant responses and management options. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1147.
- [4] Weaich K, Bristow K L, Cass A. Modeling preemergent maize shoot growth: I. Physiological temperature conditions. *Agron J*, 1996, 88: 391–397.
- [5] 闫振华, 刘东尧, 贾绪存, 杨琴, 陈艺博, 董鹏飞, 王群. 花期高温干旱对玉米雄穗发育、生理特性和产量影响. *中国农业科学*, 2021, 54: 3592–3608.
- Yan Z H, Liu D Y, Jia X C, Yang Q, Chen Y B, Dong P F, Wang Q. Maize tassel development, physiological traits and yield under heat and drought stress during flowering stage. *Sci Agric Sin*, 2021, 54: 3592–3608 (in Chinese with English abstract).
- [6] 高英波, 张慧, 单晶, 薛艳芳, 钱欣, 代红翠, 刘开昌, 李宗新. 吐丝前高温胁迫对不同耐热型夏玉米产量及穗发育特征的影响. *中国农业科学*, 2020, 53: 3954–3963.
- Gao Y B, Zhang H, Shan J, Xue Y F, Qian X, Dai H C, Liu K C, Li Z X. Effects of pre-silking high temperature stress on yield and ear development characteristics of different heat-resistant summer maize cultivars. *Sci Agric Sin*, 2020, 53: 3954–3963 (in Chinese with English abstract).
- [7] Maestri E, Klueva N, Perrotta C, Gulli M, Nguyen H T, Marmiroli N. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 667–681.
- [8] Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 53–65.
- [9] Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim J M, Seki M, Todaka D, Osakabe Y, Sakuma Y, Schö Z F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol Genet Genom*, 2011, 286: 321–332.
- [10] Liu H C, Liao H T, Charng Y Y. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 738–751.
- [11] Mishra S K, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf K D. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Gene Dev*, 2002, 16: 1555–1567.
- [12] Qu A L, Ding Y F, Jiang Q, Zhu C. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem Bioph Res Commun*, 2013, 432: 203–207.
- [13] Kotak S, Larkindale J, Lee U, Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf K D. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 310–316.
- [14] Zhong L L, Zhou W, Wang H J, Ding S H, Lu Q T, Wen X G, Peng L W, Zhang L X, Lua C M. Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *Plant Cell*, 2013, 25: 2925–2943.
- [15] Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Hirochika H, Iwabuchi M, Oda K. Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 2008, 227: 957–967.
- [16] Ayako N, Yukinori Y, Eriko Y, Takanori M, Kazuya Y, Shigeru S. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J*, 2010, 48: 535–547.
- [17] Charng Y Y, Liu H C, Liu N Y, Chi W T, Wang C N, Chang S H, Wang T T. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 143: 251–262.
- [18] Petroni K, Kumimoto R W, Gnesutta N, Calvenzani V, Fornari M, Tonelli C, Holt B F, Mantovani R. The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors. *Plant Cell*, 2012, 24: 4777–4792.
- [19] 许婧, 牛百晓, 陈忱. NF-Y 转录因子调控植物生长发育的功能研究进展. *植物生理学报*, 2022, 58: 1191–1200.
- Xu J, Niu B X, Chen C. Advances on the function of NF-Y transcription factors in regulation of plant growth and development. *Plant Physiol J*, 2022, 58: 1191–1200 (in Chinese with English abstract).
- [20] 李世贵, 马瑞, 王芳芳, 刘维刚, 杨江伟, 唐勋, 张宁, 司怀军. 植物 NF-Y 转录因子研究进展. *植物生理学报*, 2021, 57: 248–256.
- Li S G, Ma R, Wang F F, Liu W G, Yang J W, Tang X, Zhang N, Si H J. Research progresses on plant NF-Y transcription factors. *Plant Physiol J*, 2021, 57: 248–256 (in Chinese with English abstract).
- [21] 李娟, 高凯, 安新民. 转录因子 NF-Y 在植物生长发育和逆境胁迫响应中的作用. *中国细胞生物学学报*, 2021, 41: 2434–2442.
- Li J, Gao K, An X M. Roles of transcription factor NF-Y in plant growth, development and response to stress. *Chin J Cell Biol*, 2019, 41: 2434–2442 (in Chinese with English abstract).
- [22] 黄俊文, 南建宗, 阳成伟. NF-Y 转录因子调控植物生长发育及胁迫响应的研究进展. *植物生理学报*, 2020, 56: 2595–2605.
- Huang J W, Nan J Z, Yang C W. Research progress of NF-Y transcription factors in plant growth and development and stress response. *Plant Physiol J*, 2020, 56: 2595–2605 (in Chinese with English abstract).
- [23] Nelson D E, Repetti P P, Adams T R, Creelman R A, Wu J R, Warner D C, Anstrom D C, Bensen R J, Castiglioni P P, Donnarummo M G, Hinchey B S, Kumimoto R W, Maszle D R, Canales R D, Krolkowski K A, Dotson S B, Gutterson N, Ratcliffe O J, Heard J E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16450–16455.
- [24] Wang B M, Li Z X, Ran Q J, Li P, Peng Z H, Zhang J R. ZmNF-YB16 overexpression improves drought resistance and yield by enhancing photosynthesis and the antioxidant capacity of maize plants. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 709.
- [25] Yadav D, Shavrukov Y, Bazanova N, Chirkova L, Borisjuk N, Kovalchuk N, Ismagul A, Parent B, Langridge P, Hrmova M, Lopato S. Constitutive overexpression of the TaNF-YB4 gene in transgenic wheat significantly improves grain yield. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6635–6650.
- [26] Najafabadi M S. Improving rice (*Oryza sativa* L.) drought tolerance by suppressing a NF-YA transcription factor. *Iran J Biotechnol*, 2012, 10: 40–48.
- [27] Lee D K, Kim H I, Jang G, Chung P J, Jeong J S, Kim Y S, Bang

- S W, Jung H, Choi Y D, Kim J K. The NF-YA transcription factor OsNF-YA7 confers drought stress tolerance of rice in an abscisic acid independent manner. *Plant Sci*, 2015, 241: 199–210.
- [28] Sato H, Suzuki T, Takahashi F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. NF-YB2 and NF-YB3 have functionally diverged and differentially induce drought and heat stress-specific genes. *Plant Physiol*, 2019, 180: 1677–1690.
- [29] 唐伶俐. OsNF-YC4 调控水稻高温干旱胁迫响应的分子机理研究. 中国科学院大学硕士学位论文, 北京, 2017.
Tang L L. Molecular Mechanism of OsNF-YC4 Regulating Response to High Temperature and Drought Stress in Rice. MS Thesis of University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [30] Shi H, Ye T T, Zhong B, Liu X, Jin R, Chan Z L. AtHAP5A modulates freezing stress resistance in *Arabidopsis* through binding to CCAAT motif of AtXTH21. *New Phytol*, 2014, 203: 554–567.
- [31] Sato H, Mizoi J, Tanaka H, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Morimoto K, Ohori T, Kusakabe K, Nagata M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits. *Plant Cell*, 2014, 26: 4954–4973.
- [32] Sato H, Todaka D, Kudo M, Mizoi J, Kidokoro S, Zhao Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. The *Arabidopsis* transcriptional regulator DPB3-1 enhances heat stress tolerance without growth retardation in rice. *Plant Biotech J*, 2016, 14: 1756–1767.
- [33] Mei X P, Liu C X, Nan J, Zhao Z Z, Bai Y, Dong E F, Cai Y L. Overexpression of ZmNF-YC13 confers ER stress tolerance in maize. *J Plant Biol*, 2021, 64: 337–348.
- [34] Mei X P, Nan J, Zhao Z Z, Yao S, Wang W W, Yang Y, Bai Y, Dong E F, Liu C X, Cai Y L. Maize transcription factor ZmNF-YC13 regulates plant architecture. *J Exp Bot*, 2021, 72: 4757–4772.
- [35] Sidorov V, Duncan D. Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. In: Scott M P ed. Transgenic Maize. Methods in Molecular Biolog. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 526: 47–58. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4.
- [36] Fiil B K, Qiu J, Petersen K, Petersen M, Mundy J. Coimmunoprecipitation (co-IP) of Nuclear Proteins and Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) from *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Protocols, 2008. pp 1–19.
- [37] Li Y J, Humbert S, Howell S H. ZmZIP60 mRNA is spliced in maize in response to ER stress. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 144.
- [38] 梅秀鹏. 玉米内质网胁迫应答转录因子 NF-YC13 功能分析. 西南大学博士学位论文, 重庆, 2018.
Mei X P. Functional Characterization of a Transcription Factor NF-YC13 in the Endoplasmic Reticulum Stress Response in Maize (*Zea mays* L.). PhD Dissertation of Southwest University, Chongqing, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [39] Gu L, Jiang T, Zhang C X, Li X D, Wang C M, Zhang Y M, Li T, Dirk L M A, Downie A B, Zhao T Y. Maize HSFA2 and HSBP2 antagonistically modulate raffinose biosynthesis and heat tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2019, 100: 128–142.
- [40] 赵福成, 景立权, 闫发宝, 陆大雷, 王桂跃, 陆卫平. 灌浆期高温胁迫对甜玉米籽粒糖分积累和蔗糖代谢相关酶活性的影响. 作物学报, 2013, 39: 1644–1651.
Zhao F C, Jing L Q, Yan F B, Lu D L, Wang G Y, Lu W P. Effects of heat stress during grain filling on sugar accumulation and enzyme activity associated with sucrose metabolism in sweet corn. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1644–1651 (in Chinese with English abstract).
- [41] 王改妮, 白万鹏, 王锁民. 植物响应高温胁迫的信号转导和转录调控机制研究进展. 分子植物育种, 2020, 18: 8109–8118.
Wang G N, Bai W P, Wang S M. Advances in research of signal transduction and transcriptional regulatory mechanism of plants in response to heat stress. *Mol Plant Breed*, 2020, 18: 8109–8118 (in Chinese with English abstract).
- [42] Röth S, Mirus O, Bublak D, Scharf K D, Schleiff E. DNA-binding and repressor function are prerequisites for the turnover of the tomato heat stress transcription factor HsfB1. *Plant J*, 2017, 89: 31–44.
- [43] Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 53–65.
- [44] 祁茂冬, 谢鑫, 魏凤菊. 禾本科植物 HSP70 研究进展. 植物生理学报, 2019, 55: 1054–1062.
Qi M D, Xie X, Wei F J. Research progress of HSP70s in Poaceae. *Plant Physiol J*, 2019, 55: 1054–1062 (in Chinese with English abstract).
- [45] 樊芳菲, 杨滢, 康云艳, 柴喜荣, 蒙林平. 植物 DnaJ 蛋白的研究进展. 分子植物育种, 2018, 16: 2028–2034.
Fan F F, Yang X, Kang Y Y, Chai X R, Meng L P. Research progress on DnaJ proteins in plants. *Mol Plant Breed*, 2018, 16: 2028–2034 (in Chinese with English abstract).
- [46] 张驰, 刘丹丹, 刘建中. 植物 J 蛋白的生物学功能及其作用机制. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2018, 44: 275–282.
Zhang C, Liu D D, Liu J Z. Biological functions and action mechanisms of J-domain proteins in plants. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci Edn)*, 2018, 44: 275–282 (in Chinese with English abstract).
- [47] 王国栋. 番茄叶绿体 DnaJ 蛋白 SICDJ2 的功能分析. 山东农业大学博士学位论文, 山东泰安, 2016.
Wang G D. Functional Analysis of a Tomato Chloroplast DnaJ Protein SICDJ2. PhD Dissertation of Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [48] 马朝霞. 拟南芥热激蛋白 TMS1 的功能研究. 中国农业大学博士学位论文, 北京, 2015.
Ma Z X. Functional Study of the Heat Shock Protein TMS1. PhD Dissertation of China Agricultural University, Beijing, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [49] Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schöffl F. Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomic*, 2004, 271: 11–21.
- [50] Scharf K D, Heider H, Höpfeld I, Lyck R, Schmidt E, Nover L. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cellular Biol*, 1998, 18: 2240–2251.

- [51] Busch W, Wunderlich M, Schöffl F. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2010, 41: 1–14.
- [52] Baniwal S K, Bharti K, Chan K Y, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra S K, Nover L, Port M, Scharf K D, Tripp J, Weber C, Zielinski D, Koskull-Döring P. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 2004, 29: 471–487.

附表 1 本研究中所用引物

Table S1 Primers used in this study

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'–3')
ZmNF-YC13RT-F	TAGGGCTGGTCTGCCACCCAT
ZmNF-YC13RT-R	GGCTCCTGCCACAAATAAGTCACT
ZmDnaJ2RT-1F	TCAAGTTCTGCGTTTGGGGTGTTA
ZmDnaJ2RT-1R	GAAGCTAGCAAACGTATTCGAGCG
ZmDnaJ1RT-1F	TACACCGCGCACGTGACGACGC
ZmDnaJ1RT-1R	ATCGGCATGCCCTCCCCCTCGCA
ZmHSP70RT-1F	GTCGACTAAATGAGGAAATTCTGATA
ZmHSP70RT-1R	AATAAGATCCACTTTGTAAATTGACGC
AtHSP21Pro-F	CAGCTATGACATGATTACGAATTCCTTACCAAGCTTCTGAGCATCTCC
AtHSP21Pro-R	CTGAGGGGATGGTTCCATGGATCCTTGTTTCGAGTATGAGCCAAAAAT
ZmHsfA2cPro-1F	AGCCTACCTTTTATGTGATACTCC
ZmHsfA2cPro-1R	CAGTAGCCAAGTGTGAATCATTGT
ZmHsfA2cPro-2F	TCTTGCTCTCCTCTCCAGAACCT
ZmHsfA2cPro-2R	GTCGAGACACGTCGCGAGGCTT
ZmHsfA2cPro-3F	ACAGAAATATCCTAAGCGCTGAC
ZmHsfA2cPro-3R	AACACGGGGCAAGGACTCGATT
ZmHsfA2cPro-4F	TTCTCTTGGTCAGGGCTTGCTAAT
ZmHsfA2cPro-4R	TATTGCAGAGGATTCGGATGCTCT
ZmHsfA2cPro-F	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTAGTGAAGATCCAAAAGATAATA
ZmHsfA2cPro-R	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCGGCCTCCGCCAGGCCCAAGAACC
18S rRNA-F	ACCTTACCAGCCCTTGACATATG
18S rRNA-R	GACTTGACCAAAACATCTCACGAC