

玉米热激蛋白 *ZmHSP70-12* 基因的克隆及表达分析

王 帅, 祁茂冬, 魏凤菊

(华北作物改良与调控国家重点实验室/河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北 保定 071000)

摘 要: 热激蛋白 70(HSP70)是原核和真核细胞中普遍存在的一种高度保守的分子伴侣。从玉米中克隆 1 个 HSP70 家族成员。该基因 cDNA 序列全长为 1 992 bp, 开放阅读框为 2 352 bp, 编码 663 个氨基酸, 蛋白质分子量约 75.0 kD。蛋白结构预测及同源比对分析表明, 该基因编码蛋白含 ATPase 位点和 HSP70 保守结构域, 与拟南芥 *AtHSP70-12* 序列高度相似, 命名为 *ZmHSP70-12*。蛋白亚细胞定位显示, *ZmHSP70-12* 蛋白在内质网中表达。实时荧光定量 PCR 分析表明, *ZmHSP70-12* 对非生物胁迫高温、干旱均具有明显的应答反应, 推测 *ZmHSP70-12* 是玉米中与胁迫逆境相关的基因。

关键词: 玉米; 热激蛋白; *ZmHSP70-12*; 亚细胞定位; 非生物胁迫

中图分类号: S513.032

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of Heat Shock Protein Gene *ZmHSP70-12* in Maize

WANG Shuai, QI Mao-dong, WEI Feng-ju

(State Key Laboratory of Crop Improvement and Regulation in North China, Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Hebei Agriculture University, Baoding 071001, China)

Abstract: Heat shock protein 70(HSP70s) are found extensively in prokaryotic and eukaryotic and one of the most conserved molecular chaperones. In this study, a member of the HSP70 family was isolated from maize. Its full-length coding sequence was 1 992 bp, and its open reading frame is 2 352 bp. The encoded protein with molecular weight is about 75.0 kD. Through protein structure prediction and homologous alignment analysis, the gene encodes a protein containing ATPase site and HSP70 conserved domain. It is highly similar to *Arabidopsis thaliana AtHSP70-12* sequence, so it is named *ZmHSP70-12*. Subcellular localization analysis showed that the *ZmHSP70-12* protein was expressed in the endoplasmic reticulum. Real-time quantitative PCR analysis revealed *ZmHSP70-12* has an obvious response to abiotic stress, such as high temperature and drought. Therefore, it speculates that *ZmHSP70-12* is a stress-related gene in maize stress.

Key words: Maize; Heat shock protein; *ZmHSP70-12*; Subcellular localization; Abiotic stress

热激蛋白(HSP)又称热休克蛋白,遍布于植物、动物、微生物,是调节蛋白质分子的折叠、定位、积累和降解的分子伴侣,并赋予多重环境耐受性的作用。

根据它们的分子量,将 HSP 分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、sHSPs^[1]以及 HSP40 或 DnaJ 家族^[2]。HSP70 在细胞内普遍存在,被认为是最高度保守的 HSPs,并且广泛参与了植物逆境胁迫及代谢调节,所以鉴定和分析植物中 HSP70 具有潜在的重要价值^[3]。

HSP70s 是 ATP 依赖的分子伴侣, HSP70s 由 3 个结构域组成, N 端 ATPase 域(NDB)、底物结合结构域(SBD)和 C 端“盖”子结构域(C)。ATP 结合在 NDB 结构域中, HSP70 底物结合结构域的盖子打开并允许底物结合,通过各种共伴侣催化, ATP 被水解成 ADP,

录用日期: 2019-09-10

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2017082)、西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室开放课题(CSBAA2019006)

作者简介: 王 帅(1992-), 河北任丘人, 在读硕士。

Tel: 15533743858 E-mail: 1830063118@qq.com

魏凤菊为本文通讯作者。E-mail: weifj98@126.com

导致SBD盖子的闭合,将底物捕获在底物结合袋中,ATP置换出ADP,并释放结合的底物,开始新的循环^[4]。按照表达情况可分为组成型的HSC70(heat shock cognate protein 70)和诱导性的HSP70两大类^[5],前者在所有细胞内都有表达,后者在热刺激或其他胁迫下迅速增强表达。根据HSP70的定位情况可分为四亚类,细胞质定位、内质网定位、线粒体定位、质体定位^[6]。

HSP70的表达显著增加后可提高植物对环境胁迫的耐受能力,拟南芥中胞质定位的HSC70-1蛋白的过量表达可以提高耐热性和高盐度^[7]。拟南芥 *Athsp70-1/4*, *Athsp70-2/4/5* 突变体对高温、低温、高盐、渗透胁迫等非生物胁迫敏感,单一基因的突变体并不敏感,说明胞质定位的HSP70响应多种非生物胁迫且功能冗余^[8]。在烟草中,HSP70的过量表达,增强烟草脱水的耐受性^[9]。菊花 *CgHSP70*^[10]、芍药 *PIHSP70*^[11]在拟南芥中表达增强对非生物胁迫的耐受性,从而保护植物免受总体损伤;在大肠杆菌中过表达高粱 *SbHSP70-1* 赋予其热耐受性,也说明 *SbHSP70-1* 参与生物胁迫反应。拟南芥 *AtHSP70-15* 的缺陷导致其热处理下死亡率显著增加^[12], *AtHSP70-16* 的突变导致22℃下结实率显著降低,在27℃时表现更严重^[13],表明拟南芥HSP70s在正常生

长和热反应过程中起着至关重要的作用。由此可见HSP70在非生物胁迫中的重要性。

玉米(*Zea mays*)作为世界上重要的农作物,生长周期内受到多种非生物胁迫,干旱是最为严重的逆境,关于玉米HSP70家族成员响应干旱逆境的功能研究少有报道^[14-16]。实验室前期通过分析鉴定玉米HSP70家族成员,得到41个玉米热激蛋白HSP70基因。本研究克隆其中1个成员,经同源进化分析及氨基酸序列分析,命名为*ZmHSP70-12*,分析该成员的亚细胞定位和在各个组织中及胁迫条件下的表达模式,进一步鉴定玉米HSP70基因的功能,为培养玉米抗逆新品种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米材料为已经测序的自交系B73。将B73玉米种植到混合土(营养土:蛭石1:1~1:2)中,室温控制在25℃/15℃(昼/夜),光照时间为16 h/8 h(昼/夜)。根据玉米基因组数据库(<http://www.maizegdb.org/>)、NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)及Gramene(<http://www.gramene.org/>)数据所公布的*ZmHSP70-12* (*GRMZM2G114793_P01*)的cDNA序列,利用DNA-MAN设计引物(表1)。

表1 引物名称及序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primers sequence(5'-3')	用途 Purpose
ZmHSP70-12-GFP-F	GCTCTAGAATGGATCGGGCTCGCGGAT	亚细胞定位
ZmHSP70-12-GFP-R	GGACTAGTCAGCTCGTCGTGGTCGTC	亚细胞定位
ZmHSP70-12qRT-F	GCGCAGTATGACCAAGGACT	Real-time PCR
ZmHSP70-12qRT-R	CAAACAGTTACTACGCTCAGC	Real-time PCR

采用TRIzol法提取玉米RNA,反转录cDNA,选用TaKaRa PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer进行基因CDS区全长扩增,正向引物末端加入*Xba* I酶切位点,反向引物末端加入*Spe* I。反应体系为50 μL, cDNA 1 μL, 2×PrimeSTAR GC Buffer (Mg²⁺ plus) 25 μL、dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL、ZmHSP70-12-GFP-F(10 μmol/L) 1.5 μL、ZmHSP70-12-GFP-R(10 μmol/L) 1.5 μL、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(2.5 U/μL) 1 μL、ddH₂O 16 μL。反应程序为98℃变性10 s, 68℃退火2 min, 30个循环, 4℃保存备用。PCR扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收后连接至*pEASY-blunt simple*载体上,经

双酶切与测序验证序列准确性,命名为*pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP*。

1.2 系统发育关系与氨基酸保守域分析

从Gramene数据库中提取*ZmHSP70-12*基因的氨基酸序列,利用网站InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和PROSITE(<https://prosite.expasy.org/>)进行信号肽、保守结构域和基序的预测^[17];通过NCBI Blastp(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对比同源序列,利用ClustalX 2.1软件进行蛋白质多序列比对。利用Mega 5.0软件Neighbor-Joining算法构建系统进化树,Bootstrap值为1 000。

1.3 ZmHSP70-12的亚细胞定位分析

将 *pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP* 与亚细胞定位表达载体 *pSuper1300::GFP* 分别经 *Xba* I 与 *Spe* I 双酶切后,回收目的基因片段与载体线性片段,利用 Ta-kara Solution I 连接酶,16℃连接 1 h。将连接的载体转化至农杆菌 GV3101。采用已经报道的内质网定位的 HDEL-RFP 作为 marker 基因与目的基因共注烟草,正常培养 40~48 h 后,采用 OLYMPUS FV1000 荧光扫描共聚焦显微镜进行共定位观察。

1.4 非生物胁迫条件下的表达模式分析

当幼苗培养至两叶一心时期,选取生长整齐一致的植株分别做胁迫处理,模拟高温胁迫,将玉米幼苗置于 42℃ 环境中高温胁迫处理 0、2、4、6 h 取样;模拟脱水胁迫,玉米整株幼苗从土中取出,洗净,用吸水纸吸干水分,置于干净滤纸上,在相同的温室环境内处理,0、0.5、1、3、6 h 后,根、茎、叶分别取样。每个时间点分别从 3 株幼苗上取材,剪取叶、茎、根迅速置于液氮中,-80℃ 保存。

以 UBQ 作为内参基因,设计目的基因的特异性引物,将反转录所得 cDNA 稀释至浓度为 100 μg/μL 作为扩增模板。使用 Fast Super EvaGreen® qPCR Master Mix(US EVERBRIGHT INC)在 RocheLightCy-

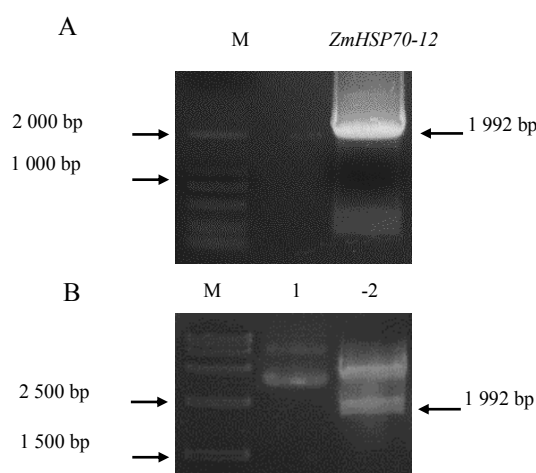
cler® 96 仪器进行 real-time PCR。20 μL 反应体系: Fast Super EvaGreen® qPCR Master Mix 10 μL、ZmHSP70-12RT-F 1 μL、ZmHSP70-12RT-R 1 μL、cDNA 1 μL、ddH₂O 7 μL。

按以下条件进行扩增:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 5 s,72℃ 延伸 25 s,45 个循环。3 次重复,反应结束后按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行试验数据的计算,分析出基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *ZmHSP70-12* 的基因克隆与构建

以玉米的总 RNA 反转录成 cDNA 为模板,利用含有两种限制性核酸内切酶 *Xba* I 和 *Spe* I 位点的引物对基因进行扩增,通过琼脂糖凝胶电泳得到 2 000 bp 左右的片段(图 1),与所查询的 *GRMZM2G114793_P01* 目的基因的 CDS 区的大小相似,测序正确后,得到克隆载体,并命名 *pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP*。将 *pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP* 进行 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切得到与预期片段大小一致。



注:A表示 *ZmHSP70-12* 的扩增,M表示 DL2000;B表示双酶切 *pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP* 验证,M表示 DL15000;1表示质粒,2表示双酶切质粒。

Note: A, Amplification of *ZmHSP70-12*; B, Restriction enzyme digestion of *pEASY-T-ZmHSP70-12-GFP*; M means DL15000; 1 means plasmid, 2 means double digested plasmid.

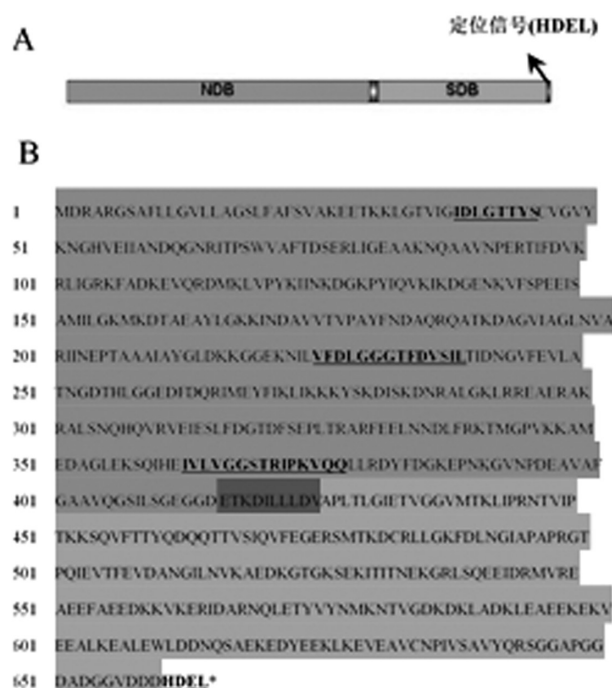
图1 *ZmHSP70-12* 基因的扩增

Fig.1 Amplification of *ZmHSP70-12* by PCR

2.2 基因氨基酸序列及同源性分析

由图 2-A 序列分析表明,*ZmHSP70-12* 蛋白含有两个功能结构域,NDB 结构域通过接头与 SDB 互连。保守的 HSP70 特征家族基序 1(IDLGTYS, 38-45aa), 2(VFDLGGGTFDVSIL, 226-239aa) 和 3(IV-

LVGGSTRIPKVQQ, 363-377aa), 同时肌动蛋白类 ATP/GTP 结合位点(AEAYLGKK, 161-168aa) 也在 *ZmHSP70-1* 序列内发现^[17];预计该蛋白质被定位在内质网中,其位于 664-667aa 的 HDEL 基序为内质网 HSP70 的特征(图 2)。



注:A表示ZmHSP70-12的域结构;颜色与B中的编码序列相对应;B表示ZmHSP70-12的氨基酸序列,保守的HSP70家族基序和HDEL基序以粗体和下划线显示,连接N-末端ATP酶结构域和C-末端底物结合结构域的接头以品红色着色。

Note: A, Domain structure of ZmHSP70-12; color coding corresponding to the sequence; B, The amino acid sequence of ZmHSP70-12, the conserved HSP70 family motif and the HDEL motif are shown in bold and underlined, the linker connecting the N-terminal ATPase domain and the C-terminal substrate binding domain with magenta.

图2 ZmHSP70-12氨基酸序列分析

Fig.2 Amino acid sequence analysis of ZmHSP70-12

通过对ZmHSP70-12的氨基酸序列在NCBI数据库中进行Blastp比对发现,水稻、高粱、二穗短柄草、谷子、大豆等有相似的氨基酸序列,利用Clustal X和

MEGA 5.0进行系统进化分析(图3),结果表明在多种物种中均有同源基因存在,ZmHSP70-12尤其与单子叶植物高粱、谷子同源相似性高。

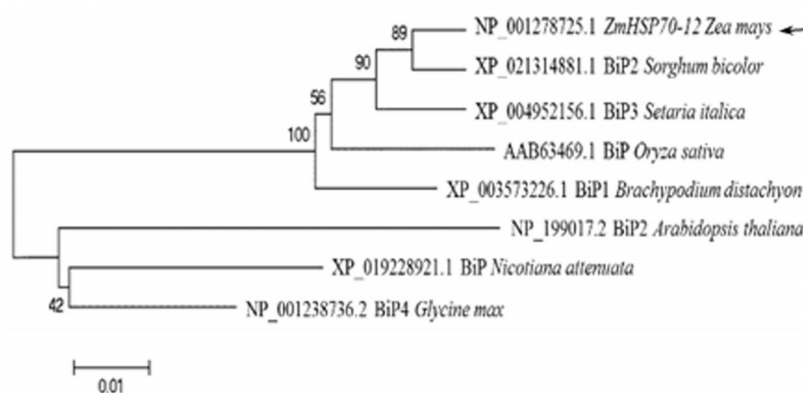


图3 ZmHSP70-12与几种植物BiP蛋白的同源进化关系

Fig.3 Phylogenetic analysis of ZmHSP70-12 and other selected plant BiP proteins

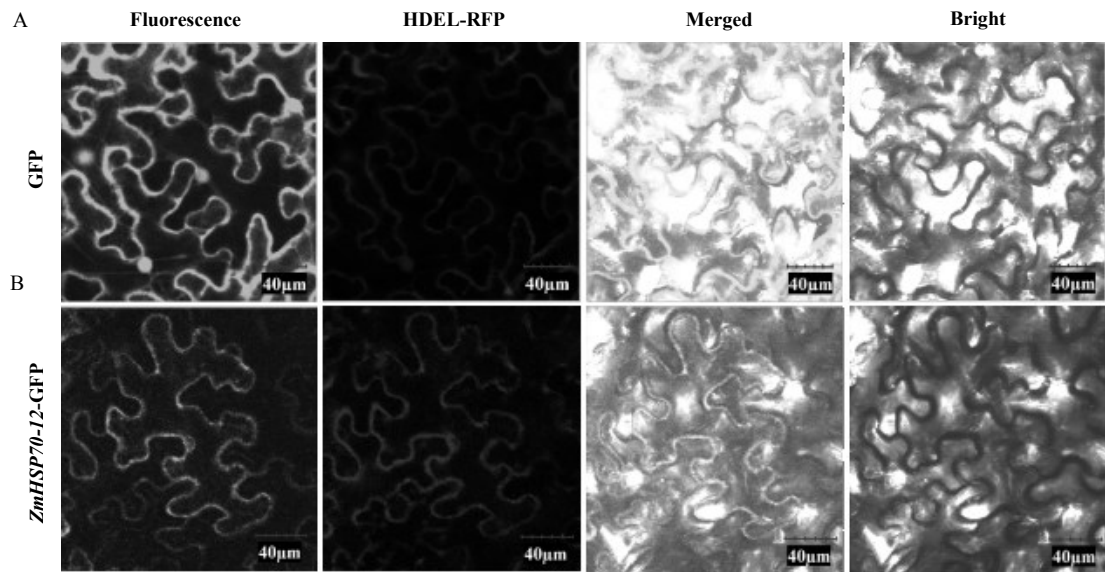
2.3 亚细胞定位

将该基因编码的蛋白在Softberry(<http://www.softberry.com/berry.phtml>), WoLFPSORT (<http://wolfpsort.org/>)网站进行亚细胞定位预测,结果显示为内质网定位。为了确定ZmHSP70-12蛋白是否定位在

内质网,将去终止子目的基因与亚细胞定位载体pSuper1300::GFP相连接,构建Super promoter启动子驱动下的亚细胞定位载体,转化GV3010农杆菌,与内质网定位表达载体HDEL-RFP共注射烟草叶片,48 h后在共聚焦显微镜下观察目的基因的表达

情况(图 4),以 pSuper1300::GFP 为对照的烟草细胞中,可见在细胞核和细胞质中均有明亮的绿色分布;注射 pSuper1300::*ZmHSP70-12-GFP* 的可见绿色位于细胞的边缘以及细胞核的周围,细胞内也能看到带有绿色荧光的丝状结构,初步推断 pSuper1300::

ZmHSP70-12-GFP 的融合蛋白在内质网表达。为了进一步印证这一推测,用内质网定位的红色荧光蛋白表达载体 HDEL-RFP 作为对照,发现当两种荧光叠加后,呈现出黄色荧光,证明 *ZmHSP70-12* 蛋白定位在内质网,这与生物信息预测的结果相一致。



注:A表示对照组Super1300::GFP;B表示试验组 Super1300::*ZmHSP70-12-GFP*。
Note: A, Super1300::GFP as control; B, Super1300::*ZmHSP70-12-GFP* as experimental group

图 4 玉米 Super1300::*ZmHSP70-12-GFP*融合蛋白在烟草中的亚细胞定位

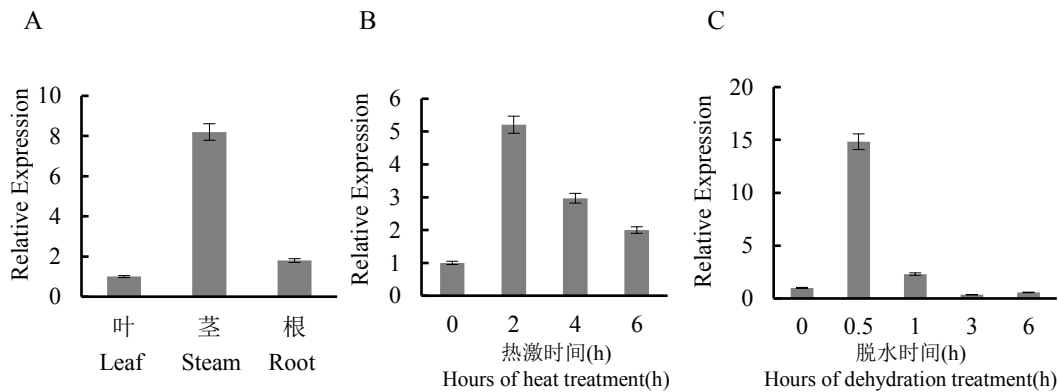
Fig.4 Subcellular localization of maize Super1300::*ZmHSP70-12-GFP* fusion protein in tobacco cells

2.4 基因在非生物胁迫条件下的表达分析

检测正常条件下两叶一心期的玉米幼苗各组织中 *ZmHSP70-12* 基因表达量,RT-qPCR 检测结果显示,在茎中的表达量最高,根中的表达量次之,叶片中表达量最低(图 5)。

将幼苗分别在高温(42℃)和脱水条件下处理不

同时间,分别提取各时间点叶片的 RNA 反转录成 cDNA,通过 RT-qPCR 检测各时间点目的基因的表达量。在高温 2 h 时, *ZmHSP70-12* 表达量明显增高,受高温诱导的高表达状态一直持续到 6 h;干旱处理条件下, *ZmHSP70-12* 在 0.5 h 时表达量明显增高。



注:A表示各组织的表达分析;B表示热激条件下的表达分析;C表示脱水条件下的表达分析。
Note: A, Expression analysis in different tissues; B, Expression analysis under heat shock conditions; C, Expression analysis under dehydration stress.

图 5 RT-qPCR 检测 *ZmHSP70-12* 在不同胁迫下的表达

Fig.5 RT-qPCR analysis of *ZmHSP70-12* expression in different abiotic stress

3 结论与讨论

内质网定位的 HSP70 又称免疫球蛋白结合蛋白(BiP),是内质网腔中最丰富的分子伴侣之一^[18]。BiP 蛋白除含有 NDB 域和 SDB 域外,并且其末端有内质网定位的特殊氨基酸序列(HDEL),其中 SDB 域结合到新生的疏水表面蛋白质并通过 ATP 依赖性机制保护它们免受聚集^[18]。本研究中通过蛋白结构域、进化树分析及亚细胞定位结果表明,*ZmHSP70-12* 蛋白可能属于内质网定位的 BiP 蛋白。*BiP* 基因在植物组织和植物发育过程中高度表达,具有高细胞分泌活性,能使细胞快速分裂^[19]。已有研究证明,拟南芥 BiP 在雌配子体发育过程中作用于极性核的融合^[20],当水稻 *OsBiP1* 的表达受到严重抑制时不仅改变了种子表型和胚乳细胞的细胞内结构,而且还降低了种子贮藏蛋白质含量,淀粉积累和谷粒重量^[21]。当折叠错误的蛋白质在内质网中积累时,折叠压力和折叠承受力之间的平衡被打破,导致内质网应激^[22]。Yang^[23]发现,*OsBiP* 基因过表达减轻由高温诱导的内质网应激,从而减少细胞自噬。大豆 GmBiP 蛋白在烟草中的过表达通过防止内源性氧化应激并赋予植物生长期对水分亏缺的耐受性,并且在大豆中观察到类似的结果^[24]。Wang^[25]等人研究发现,*CaBiP1* 的沉默降低了胡椒对内质网应激和环境胁迫的耐受性,*CaBiP1* 在拟南芥中的过表达增强了对非生物胁迫的耐受性。由于 *ZmHSP70-12* 基因的表达水平在脱水 and 高温条件下有所增加,推测该基因在非生物胁迫下可能发挥非常重要的作用,同时也可能参与了内质网应激的反应过程。

在进化过程中,植物已经开发出 1 种综合机制来减轻不利环境条件引起内质网应激,其中一个重要的方式是上调内质网分子伴侣的转录以提高蛋白质折叠的能力^[26]。由于分子伴侣在介导其他蛋白质的正确组装时,其本身不是功能结构的最终形态^[27],所以 HSP70 在行使功能时需要依赖 HSP70 系统,该系统由 3 种类型典型的伴侣组成,即 ATP 调节的 HSP70(DnaK)、不依赖 ATP 的辅助伴侣 HSP40(DnaJ)和核苷酸交换因子(NEF)。在胁迫情况下,底物和 HSP70 之间的相互作用是由 HSP40 的 J 结构域介导的^[28]。HSP40s 在伴侣介导的蛋白质折叠的早期阶段过程中,将底物识别并递送至 HSP70,然后刺激 HSP70 的 ATPase 活性,使 ATP 分解成 ADP, HSP70 与底物相互作用^[29],NEF 促进 ADP 的释放,并使 ATP 的重新结合,伴随 NEF 的解离,完成交换反应。BiPs 和 DnaJ 蛋白之间存在不同的亲和力。Masaru^[30]等人

通过共免疫沉淀试验证明,水稻 *OsP58A*、*OsP58B* 和 *OsERdj3B* 优先与 *OsBiP1* 相互作用,而 *OsERdj3A* 优先与 *OsBiP5* 相互作用。另外,番茄 *HSP70* 的表达受到热激转录因子(Hsfs)的调控,正常条件下 HSP70 与 Hsfs 结合,当受到胁迫时, HSP70 与 Hsfs 分离, HSP70 发挥其功能,同时 Hsfs 与 Hsfs 转录元件(HSE)结合,启动 *HSP70* 基因的大量转录并大量合成蛋白^[31]。

本文通过实时定量 RT-qPCR 检测表明,正常条件下茎中的表达量最高,42℃高温胁迫 2 h 时,表达量明显最高;在干旱诱导 0.5 h 时表达量最大,研究结果为进一步鉴定玉米 *HSP70* 基因功能,并培养玉米抗逆新品种提供理论基础。

参考文献:

- [1] Sanmiya K, Suzuki K, Egawa Y, et al. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants[J]. FEBS letters, 2004, 557(1-3): 265-268.
- [2] Qiu X B, Shao Y M, Miao S, et al. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(22): 2560-2570.
- [3] 张古文,刘莉莉,王显瑞,等. 谷子 HSP70 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(7): 1127-1133.
- [4] Zhang G W, Liu L L, Wang X R, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of HSP70 genes in *foxtail millet*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(7): 1127-1133. (in Chinese)
- [5] Usman M G, Rafii M Y, Martini M Y, et al. Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress [J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2017, 33(1): 26-39.
- [6] 妍 齐,徐兆师,李盼松,等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 507-511.
- [7] Yan Q, Xu Z S, Li P S, et al. Research Progress on Molecular Mechanism and Application of HSP70 in Plants[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(3): 507-511. (in Chinese)
- [8] Guy C L, Li Q B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family[J]. Plant Cell, 1998, 10(4): 539-556.
- [9] Sung D Y, Kaplan F, Guy C L. Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 113: 443-451.
- [10] Leng L N, Liang Q Q, Su W, et al. A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Research, 2017, 130(2): 349-363.
- [11] Cho E, Hong C. Over-expression of tobacco *NtHSP70-1* contributes to drought-stress tolerance in plants[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(4): 349-358.
- [12] Song A P, Zhu X R, Chen F D, et al. A chrysanthemum heat shock protein confers tolerance to abiotic stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(3): 5063-5078.

- [11] Zhao D Q, Xia X, Su J H, et al. Overexpression of herbaceous peony HSP70 confers high temperature tolerance[J]. BMC genomics, 2019, 20(1): 70.
- [12] Jungkuntz I, Link K, Vogel F, et al. *AtHsp70-15*-deficient Arabidopsis plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV[J]. Plant Journal, 2011, 66(6): 983–995.
- [13] Chen X, Shi L, Chen Y Q, et al. Arabidopsis *HSP70-16* is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures [J]. Plant Cell Environ. 2018, 42(4): 1190–1204.
- [14] Pegoraro C, Mertz L M, Maia L C, et al. Importance of heat shock proteins in maize[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2011, 14(2): 85–95.
- [15] 李慧聪, 郭秀林, 王冬梅, 等. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 12–15, 25.
Li H C, Guo X L, Wang D M, et al. Responses of *HSP70* gene expression to temperature stresses in maize[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(6): 12–15, 25. (in chinese)
- [16] 胡秀丽, 李艳辉, 杨海荣, 等. HSP70 可提高干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护能力[J]. 作物学报, 2010, 36(4): 636–644.
Hu X L, Li Y H, Yang H R, et al. Heat shock protein 70 may improve the ability of antioxidant defense Induced by the combination of drought and heat in maize leaves[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(4): 636–644. (in chinese)
- [17] Mulaudzi-Masuku T, Mutepe R D, Mukhoru O C, et al. Identification and characterization of a heat-inducible Hsp70 gene from *Sorghum bicolor* which confers tolerance to thermal stress[J]. Cell Stress & Chaperones, 2015, 20(5): 793–804.
- [18] Howell S. Endoplasmic reticulum stress responses in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 477–499.
- [19] Cheng Q, Zhou Y, Liu Z, et al. An alternatively spliced heat shock transcription factor, *OsHsFA2dl*, functions in the heat stress-induced unfolded protein response in rice[J]. Plant Biol(Stuttg), 2015, 17(2): 419–429.
- [20] Maruyama D, Endo T, Nishikawa S. BiP-mediated polar nuclei fusion is essential for the regulation of endosperm nuclei proliferation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(4): 1684–1689.
- [21] Wakasa Y, Yasuda H, Oono Y, et al. Expression of ER quality control-related genes in response to changes in *BiP1* levels in developing rice endosperm[J]. Plant Journal, 2011, 65(5): 675–689.
- [22] Wan S C, Jiang L W. Erratum to: Endoplasmic reticulum(ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants[J]. Protoplasma, 2016, 253(3): 765.
- [23] Yang X C, Srivastava R, Howell S H, et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress[J]. Plant Journal, 2016, 85(1): 83–95.
- [24] Valente M A, Faria J A, Soares-Ramos J R, et al. The ER luminal binding protein(BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(2): 533–546.
- [25] Wang H, Niu H H, Zhai Y F, et al. Characterization of BiP genes from pepper(*Capsicum annuum* L.) and the role of *CaBiP1* in response to endoplasmic reticulum and multiple abiotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1122.
- [26] Duwi Fanata W I, Lee S Y, Lee K O. The unfolded protein response in plants: a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses[J]. J. Proteomics, 2013, 93: 356–368.
- [27] Ellis J. Proteins as molecular chaperones[J]. Nature, 1987, 328(6129): 378–379.
- [28] Mayer M P, Rudiger S, Bukau B. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates[J]. Biological Chemistry 2000, 381(9): 877–885.
- [29] Young J C. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2010, 88(2): 291–300.
- [30] Ohta M, Wakasa Y, Takahashi H, et al. Analysis of rice ER-resident J-proteins reveals diversity and functional differentiation of the ER-resident Hsp70 system in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(18): 5429–5441.
- [31] Hahn A, Buback D, Schleiff E, et al. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat Stress transcription factors in tomato [J]. Plant Cell, 2011, 23(2): 741–755.

(责任编辑:姜媛媛)