

赵志雄,关媛,王慧,等. *ZmDIR11*调控玉米抗盐胁迫机制研究[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(2): 158-169.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.02.016

## *ZmDIR11*调控玉米抗盐胁迫机制研究

赵志雄<sup>1</sup>, 关媛<sup>2</sup>, 王慧<sup>2</sup>, 顾炜<sup>2</sup>, 于典司<sup>2</sup>, 郑洪建<sup>2</sup>, 秦涛<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学水产与生命科学学院, 上海 201306; 2. 上海市农业科学院作物育种栽培研究所/CIMMYT-中国特用玉米研究中心/上海特用玉米工程技术研究中心/上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201403

**摘要** 为挖掘玉米抗盐代谢胁迫调控关键基因, 克隆玉米 *DIR* 基因家族成员 *ZmDIR11* (Zm00001d012432), 对其基因及蛋白结构进行预测, 分析表达模式, 并进一步在玉米 B73-EMS 突变体中探索 *ZmDIR11* 参与耐盐胁迫的调控模式。结果显示, *ZmDIR11* 编码包含 Dirigent 结构域的多肽, 其启动子区域 ARE、MYB、MYC、STRE、LTR、MBS 结构元件均与非生物胁迫调控相关。*ZmDIR11* 在玉米根系中优势表达, 且受盐胁迫诱导上调表达, 亚细胞定位于内质网中。在盐胁迫处理后突变体玉米植株生长势及物质积累显著低于野生型 B73 材料, 且氧化代谢调控路径、脯氨酸积累、叶绿素合成、木脂素积累、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  转运通路被抑制, 相关代谢指标显著低于野生型 B73 材料。结果表明, *ZmDIR11* 在玉米中正向调控玉米抗盐代谢通路, 突变后降低了玉米的耐盐性。

**关键词** 玉米; 生物信息学; *ZmDIR11*; *DIRs* 基因; 盐胁迫; 耐盐机制

**中图分类号** S513.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)02-0158-12

盐胁迫 (salt stress) 是指植物在高盐度环境中生长时所受到的高渗透势影响, 包括土壤中游离矿物质如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$  等离子对植物生长发育所产生的抑制作用。在农业生产中, 土壤盐渍化所导致的对作物的盐胁迫是干扰作物正常生长发育过程的一个重要限制因素。土壤盐渍化区域占据了全球近 1/5 的农业土地面积。在中国西北等地区分布着大面积的盐渍化土地, 由于持续性的地下水过度开采和化肥过度使用, 土壤盐渍化也逐渐成为制约我国农业生产的主要障碍。在盐渍化土壤中, 作物受到的生长阻碍主要是由高渗透势差导致的氧化胁迫、离子损伤和渗透胁迫等所造成, 导致作物严重减产甚至绝收<sup>[1]</sup>。玉米作为我国的三大粮食作物之一, 挖掘玉米耐盐基因、解析玉米耐盐机制、提高玉米的耐盐性对于实现粮食安全和农业生产的可持续发展非常重要。

挖掘玉米耐盐基因能够为利用基因工程加快玉米耐盐育种进程提供重要的基础材料。研究人员围绕玉米的耐盐机制开展了长期的研究, 挖掘鉴定了相当数量的抗性基因和分子调控途径, 涉及编码转

录因子、蛋白激酶以及蛋白代谢等功能。转录因子是一类能与基因特定序列专一性结合并使该基因在特定时间和空间以特定的强度表达的一类蛋白质<sup>[2]</sup>。最新研究发现, *ZmWAKY86* 作为 WAKY 转录因子家族核心成员, 被证实是玉米耐盐性的正调控因子<sup>[3]</sup>。Fu 等<sup>[4]</sup>通过在拟南芥中过表达玉米转录因子 *ZmEREB20*, 发现该基因能通过提高 ABA 响应途径的敏感性来增强拟南芥的耐盐性。蛋白激酶是在植物生长发育和抵抗逆境的信号转导途径中起着催化蛋白质磷酸化作用的酶。玉米耐盐性的调控涉及多个蛋白激酶基因, 这些基因通过不同的信号转导途径参与玉米对盐胁迫的响应。*ZmBSK7* 编码一个油菜素类固醇信号激酶, 研究表明该基因在调控玉米耐盐性中发挥着积极作用, 敲除 *ZmBSK7* 能明显降低玉米植株对盐胁迫的敏感性<sup>[5]</sup>。研究人员鉴定到 1 个玉米类钙调磷酸酶 B 蛋白互作蛋白激酶基因 (*CIPK*) *ZmCIPK21*, 发现它的过表达能增强拟南芥的耐盐性<sup>[6]</sup>。植物在响应逆境胁迫时, 会产生不同的代谢物质如脯氨酸、甜菜碱和可溶性糖等调节植物体内渗透压, 或产生相应的活性酶来增强环境适应

收稿日期: 2024-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32101754; 32001555; 32172033); 上海市农业科技创新项目 [沪农科 (K2024004)]

赵志雄, E-mail: 1141582197@qq.com

通信作者: 秦涛, qintaox@126.com

性<sup>[7-8]</sup>。因此,能够增强特定代谢物质表达的基因也是植物耐盐基因挖掘的重要对象。研究显示,玉米糖转运蛋白基因 *ZmSWEET1b* 能够正调控玉米对盐胁迫的响应能力<sup>[9]</sup>, *ZmSTG1* 基因过表达能通过维持光系统活性来提高玉米的耐盐性<sup>[10]</sup>。

*DIRs* 基因编码 Dirigent 蛋白,在多种药用植物及木本植物中被证明是植物木脂素生物合成途径的关键蛋白。在木脂素代谢通路中,发现与漆酶共同催化松柏醇单体形成松脂醇为下游木脂素合成提供底物<sup>[11]</sup>。*DIRs* 是一类保守的蛋白基因,存在于所有的植物中,其蛋白序列均包含至少1个 Dirigent 结构域<sup>[12]</sup>。通过构建不同植物 *DIRs* 基因的系统发育树发现, *ZmDIR11* 属于 DIR-g 亚家族。目前,拟南芥中共鉴定出26种 *AtDIR* 基因<sup>[13]</sup>,水稻中共鉴定出55种 *OsDIRs* 基因<sup>[14]</sup>,小麦中共鉴定135个 *TaDIRs* 基因<sup>[15]</sup>,甘蔗中共鉴定到64个 *ScDIRs* 基因<sup>[16]</sup>。研究表明 *AtDIR5*、*AtDIR7*、*AtDIR9* 受盐胁迫诱导表达<sup>[17]</sup>, *TaDIR13* 和 *TaDIR14* 也能对盐胁迫处理作出反应<sup>[15]</sup>,还发现 *OsDIR55* 的过表达可以改变根部扩散屏障从而增强水稻的耐盐性<sup>[18]</sup>。但目前尚缺乏 *DIR* 响应盐胁迫的分子机制研究,在玉米中关于 *DIRs* 基因的报道也较少。本研究通过对鲜食玉米耐盐转录组数据分析得到1个能对盐胁迫诱导作出反应的 *ZmDIR11* (*Zm00001d012432*) 基因,对该基因进行生物信息学分析,进一步在玉米 B73-EMS 突变体中探索 *ZmDIR11* 参与耐盐胁迫的调控模式,以期玉米耐盐性遗传改良提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试玉米 (*Zea mays* L.) 材料为 B73 自交系,亚细胞定位所用材料为本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* L.), 由上海市农业科学院玉米中心提供,突变体材料从玉米 EMS 突变库 (<https://elabcaas.cn/>) 中获得。玉米和烟草植株置于白天 28 °C/夜晚 21 °C 的人工气候室中,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,植株在盛装有含品氏土、蛭石和珍珠岩等体积混合土壤的 10 m<sup>3</sup> 黑色方钵中生长,用 1/2 Hogland 营养液培育。在盐胁迫实验中,当玉米长到3叶期时,对照组用 1/2 Hogland 营养液处理,胁迫组用 1/2 Hogland 配制 200 mmol/L 的 NaCl 溶液处理,在不同时间点采集玉米苗期第2片平展真叶速冻于液氮中,在-80 °C 冰箱保存,用于后续研究。

### 1.2 *ZmDIR11*<sup>ems</sup> 突变体株系的建立

从玉米 EMS 突变库 (<https://elabcaas.cn/>) 中获得第1代 *ZmDIR11* 突变体种子。本研究使用的2种突变体为 EMS4-3f0544 (*ZmDIR11*<sup>ems-1</sup>) 和 EMS4-15dd8f (*ZmDIR11*<sup>ems-2</sup>)。获得突变体种子后与野生型 B73 杂交,背景材料纯化2代,后自交2代,通过 PCR-琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性突变位点,引物为 *ZmDIR11*-F: ATCCTACATCTGCCTGCCCTCT; *ZmDIR11*-R: TGACATTATTCCACCCGTTTC。选择每种突变体的纯合系进行盐胁迫表型分析。

### 1.3 *ZmDIR11* 的生物信息学分析

通过 MaizeGDB 查询 *ZmDIR11* 及其他 *ZmDIRs* 基因和蛋白信息,使用 DNAMAN 软件进行蛋白和核苷酸序列的多重比对,结合利用 ExPASy 在线网站 (<https://web.expasy.org/>) 对 *ZmDIR11* 蛋白序列进行模型预测。利用 IBS 2.0 在线网站 (<https://www.ibs.renlab.org/#/home>) 绘制 *ZmDIR11* 基因结构和蛋白结构域示意图。另外,在 STRING 蛋白数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 查询、预测 *DIR11* 蛋白的互作网络并进行 GO 富集分析。调取基因组上 *ZmDIR11* 起始密码子前 2 000 bp 序列,利用 PlantCare 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *ZmDIR11* 启动子区域进行启动子元件分析,并利用 Tbttools 软件进行可视化预测。其他物种的 *DIRs* 序列从 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库中查询获得,序列比对通过 MEGA X 软件进行,系统发育树通过 tbttools 软件构建。

### 1.4 逆转录 qPCR 分析

使用天根 TRIZol 总 RNA 提取试剂盒 (DP405) 提取玉米叶片总 RNA,然后使用 HiScript III All-in-one RT Supermix (Vazyme, 南京, 中国) 试剂盒将玉米总 RNA 逆转录为 cDNA。采用 ChamQ SYBR color qPCR Master Mix 试剂盒 (Vazyme) 进行 RT-qPCR。RT-qPCR 分析使用美国应用生物系统公司的 Applied Biosystems 荧光定量 PCR 分析仪 (QuantStudio™ 6 Flex) 完成, RT-qPCR 引物见表 1, *ZmACTIN1* 用作内参基因。

### 1.5 亚细胞定位

将 *ZmDIR11* 序列扩增克隆并构建到载体 pCambia1305-GFP 中,将 *AtH2B* 序列以及 *AtWAK-HDEL* 序列构建到载体 pCambia1305-RFP 中,载体构建完成后提取质粒,转染 GV3101 农杆菌

表 1 RT-qRCR 引物  
Table 1 RT-qRCR primer

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
ZmDIR11-RT-qPCR-F	TCGCACTCGCATCCTCAAGCAAGC
ZmDIR11-RT-qPCR-R	TCCCATCCAGAGGCAGCCGAAC
ZmACTINE1-RT-qPCR-F	ATGTTTCCTCCCATTGCCGAT
ZmACTINE1-RT-qPCR-R	CCAGTTTCGTCTACTCTCCCTTG
ZmCAT1-RT-qPCR-F	GGAACAACAACCTCTGCCCTCACCG
ZmCAT1-RT-qPCR-R	CAAAGAAACCCTTGGCACTGGCTC
ZmCAT3-RT-qPCR-F	GCGTTGAAACCTAACCCGAAAA
ZmCAT3-RT-qPCR-R	AAACCCTCCATGTGCCTGTAATCTT
ZmSOD1-RT-qPCR-F	GGTCGCTGGGGTCATTCACTTCTT
ZmSOD1-RT-qPCR-R	GCCCAAATGTCGTTGTCGTCAAA
ZmPOD1-RT-qPCR-F	CCCATCAAGGAGGAGTTCCCAATC
ZmPOD1-RT-qPCR-R	ATCTGCTTGCCAAAACTTGCTCTC
ZmSOS1-RT-qPCR-F	TCATCATCCTCACAATGGCTCTAA
ZmSOS1-RT-qPCR-R	ACCAACTTGCGTGGGACAACTTTA
ZmSOS2-RT-qPCR-F	ATGGCTGGTTACCTTCCCTTTGAG
ZmSOS2-RT-qPCR-R	TACAGTCTTGGCTGGCTTTCTTGA
ZmNHX1-RT-qPCR-F	TAGAGAAGTGGAAGATTGTCGG
ZmNHX1-RT-qPCR-R	CTAGGTTGTTGAGTATGGCCTG
ZmHAK4-RT-qPCR-F	ATCACTACCATCCTGCTCTCCC
ZmHAK4-RT-qPCR-R	GCCATCTCGTACTCTGCCTTGC
ZmHKT1-RT-qPCR-F	GTACTTCCTTTTGATCTCCGTTTT
ZmHKT1-RT-qPCR-R	TGAGGTGTTTCTCTCTTGTCTCTG
ZmHKT1;2-RT-qPCR-F	GTTTGAAGAGGATTCCAAAAGGG
ZmHKT1;2-RT-qPCR-R	TTCGACAACAATGCTGAGTACGT

感受态,制备混合液注射入生长 4 周的烟草叶片中<sup>[19]</sup>。烟草暗培养 36 h 后,进行激光共聚焦观察拍照。定位对照蛋白 H2B 是核定位的组蛋白<sup>[20]</sup>,WAK-HDEL 蛋白则定位于内质网中,WAK 是细胞壁相关激酶蛋白<sup>[21]</sup>,HDEL 是一段特殊的内质网滞留多肽信号<sup>[22]</sup>。

1.6 玉米叶片代谢指标的测定

测定玉米第 2 片真叶 MDA、脯氨酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、超氧阴离子的含量及玉米叶片中 SOD、CAT、POD 酶的活性,将 12 日龄的幼苗在 200 mmol/L 的 NaCl 溶液处理 3 d(对照材料为 1/2 Hogland 营养液)。指标检测均使用索莱宝公司生产的试剂盒进行,方法为微量法,使用酶标仪检测(MDA 检测试剂盒货号为 BC0025,Pro 检测试剂盒货号为 BC0295, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>检测试剂盒货号为 BC3595,超氧阴离子含量检测试剂盒货号为 BC1295,SOD 检测试剂盒货号为 BC0175, CAT 检测试剂盒货号为 BC0205,POD 检测试剂盒货号为 BC0095)。Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>的测定,采用苗期玉米第 2 片真叶,在 70 ℃烘箱干燥 2 d 后,磨碎称样 0.1 g

处理后使用火焰分光光度法测定<sup>[23]</sup>。叶绿素的提取采用玉米幼苗第 2 片新鲜真叶,剪碎称取 0.1 g 用有机溶剂提取法提取,提取试剂购买自上海源叶公司。在酶标仪上测定 663 和 645 nm 处的吸光值,计算叶绿素含量。总木脂素含量的测定使用甲醇作为木脂素萃取溶剂,料液比为 1:20(*m/V*),设置超声波萃取仪器功率为 2 500 W,40 ℃萃取 1 h、离心取上清使用植物总木脂素 ELISA 检测试剂盒(Chemical Book,货号 CB21405974)进行检测。

1.7 统计分析

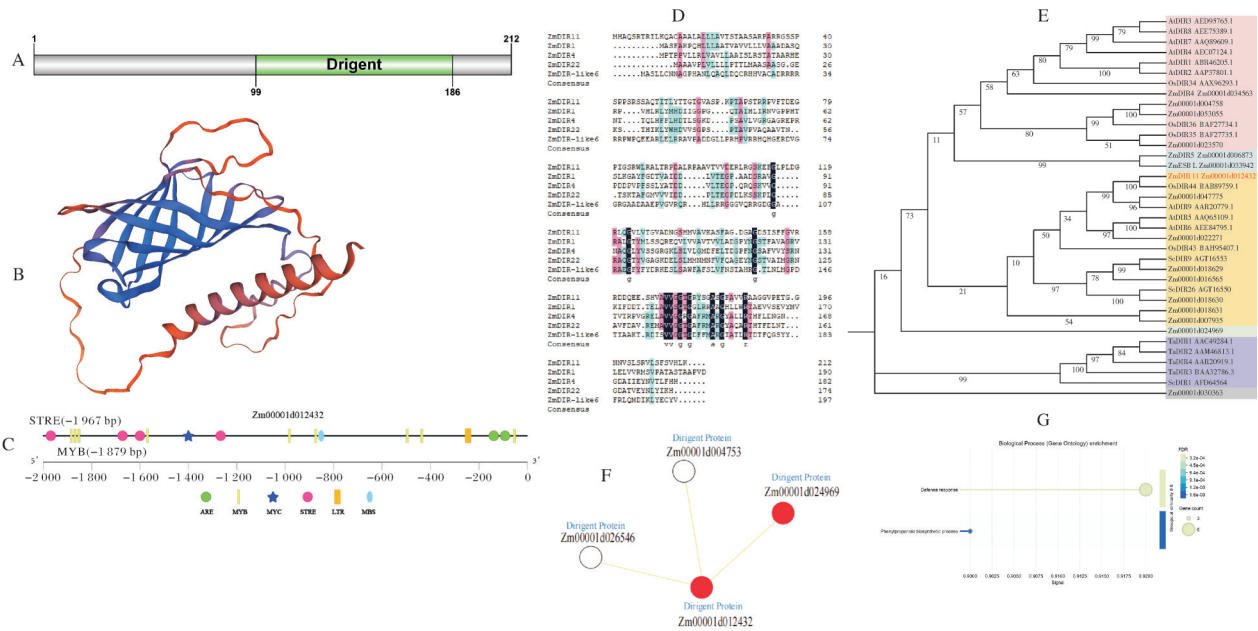
使用 GraphPad Prism8.0 版软件进行统计分析,使用 Tukey 多重比较进行单向或双向方差分析。

2 结果与分析

2.1 ZmDIR11 基因的克隆与生物信息分析

前期在鲜食玉米耐盐胁迫转录组数据中得到 1 个受盐胁迫诱导上调表达的基因 *Zm00001d012432*,命名为 *ZmDIR11*。通过生物信息学分析,发现该基因位于玉米第 8 条染色体,仅含有 1 个外显子,具有 *DIRs* 基因的经典结构<sup>[24]</sup>。对该基因进行扩增并测序,发现该基因全长 639 bp,编码 1 个由 212 个氨基酸组成的 Dirigent 蛋白。该蛋白包含 1 个 Dirigent 结构域,位于肽段 99~186 氨基酸区域(图 1A);其蛋白质预测模型也具备典型的 Dirigent 蛋白结构特征(图 1B);启动子元件分析(图 1C)显示,在 *ZmDIR11* 的启动子区域存在包含 ARE、MYB、MYC、STRE、LTR 以及 MBS 共 6 种与非生物胁迫相关的启动子<sup>[25]</sup>,其中共有 9 个 MYB 类启动子元件,说明该启动子元件能被 MYB 转录因子特异性识别并结合。通过 NCBI 数据库查询到部分其他玉米 *ZmDIRs* 基因的蛋白序列,并将它们同 *ZmDIR11* 蛋白序列进行比对,发现它们存在类似的保守氨基酸区域(图 1D)。为进一步探索 *ZmDIR11* 的同源性,利用 TBtools 软件构建了 *ZmDIR11* 的系统发育树,并与其他物种(拟南芥、水稻、甘蔗)进行比较,发现 *ZmDIR11* 与 *OsDIR44* 高度同源(图 1E)。通过查找 STRING 蛋白数据库,发现 *ZmDIR11* 蛋白可能与其他 3 种玉米 DIR 蛋白(*Zm00001d024969*、*Zm00001d004753* 和 *Zm00001d026546*)存在互作,表明 *ZmDIR11* 可能与其他 DIR 蛋白共同发挥功能(图 1F)。此外,STRING 数据库 GO 富集分析显示,*ZmDIR11* 的生物学功能相对集中在植物防御反应和苯丙素生物合成过程(图 1G)。





A. *ZmDIR11* 蛋白包含 1 个 Dirigent 结构域; B. *ZmDIR11* 的蛋白结构预测模型; C. *ZmDIR11* 的启动子区域非生物胁迫相关启动子元件分析示意图; D. *ZmDIR11* 与部分玉米 DIR 蛋白序列比对结果; E. 玉米 (*ZmDIRs*) 与拟南芥 (*AtDIRs*)、水稻 (*OsDIRs*)、甘蔗 (*ScDIRs*) 的 DIR 系统发育分析; F. *ZmDIR11* 蛋白的互作网络预测, 红色表示直接相互作用, 白色表示间接相互作用; G. *ZmDIR11* 关于 biological process 的 GO 富集分析。A. *ZmDIR11* protein contains a dirigent domain; B. Protein structure prediction model of *ZmDIR11*; C. Schematic diagram of abiotic stress-related promoter element analysis in the promoter region of *ZmDIR11*; D. Sequence alignment results of *ZmDIR11* and some maize DIR proteins; E. DIR phylogenetic analysis of maize (*ZmDIRs*) and Arabidopsis (*AtDIRs*), rice (*OsDIRs*), and sugarcane (*ScDIRs*); F. Interaction network prediction of *ZmDIR11* protein, red represents direct interaction and white represents indirect interaction; G. GO enrichment analysis of *ZmDIR11* on biological process.

图 1 *ZmDIR11* 的基本信息  
Fig.1 Basic information about *ZmDIR11*

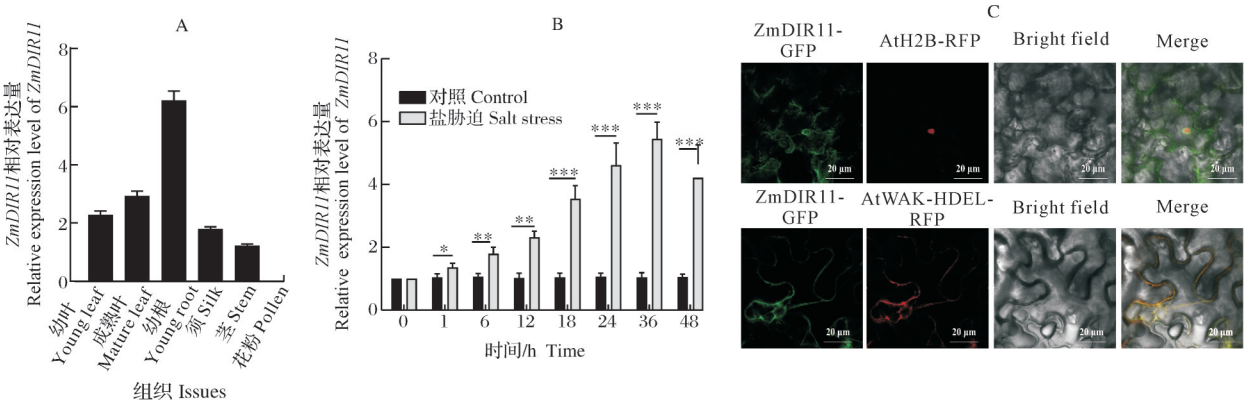
## 2.2 *ZmDIR11* 的表达模式与亚细胞定位

采用 RT-qPCR 检测 *ZmDIR11* 的组织表达模式, 结果显示, *ZmDIR11* 在玉米幼叶、成熟叶、幼根、茎、须和花粉等组织中均有不同程度的表达, 其中在幼根中的转录水平最高, 茎中表达量最低 (图 2A)。同时, 检测 *ZmDIR11* 在盐胁迫不同处理时间 (0、1、6、12、24、36 和 48 h) 的叶片中的表达情况 (图 B), 对照组 *ZmDIR11* 在各时间点的表达量保持不变, 在受到盐胁迫时, *ZmDIR11* 的表达会随时间的推移而上升, 在 36 h 达到最高水平, 48 h 后有所下降。用本氏烟草叶片进行蛋白瞬时表达 (图 2C)。结果显示, *ZmDIR11* 蛋白与 AtWAK-HDEL-RFP 共定位于内质网上。内质网是植物细胞代谢物合成的细胞器之一, 说明 *ZmDIR11* 可能参与代谢物合成。

## 2.3 *ZmDIR11* 在玉米中的抗盐调控机制

用 200 mmol/L 的 NaCl 溶液处理 3 叶期的 B73 野生型幼苗和 *ZmDIR11<sup>ems</sup>* 突变体幼苗。对照组野生型 (WT) 和突变体 (*ZmDIR11<sup>ems</sup>*) 材料的幼苗生长特性没有显著差异。而在盐胁迫处理下, 突变体植株

萎蔫和失绿更严重 (图 3A)。野生型和 *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株的平均株高分别为 34.6、34.1 和 33.5 cm, 野生型与突变体植株之间无差异。而在盐胁迫处理条件下, 植株生长受到抑制, 野生型植株的平均株高为 23.0 cm, *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株的平均株高分别为 15.1、14.6 cm, 野生型植株与突变体植株差异显著 (图 3B)。同样, 对照组野生型和 *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株的平均根长分别为 34.9、33.0 及 35.2 cm, 突变体与野生型之间根长差异不显著。经过盐胁迫处理, 突变体植株的根部生长受抑制程度更深, *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株的平均根长分别仅有 16.9 和 16.4 cm, 而野生型植株的平均根长仍有 24.1 cm, 显著高于突变体植株 (图 3C)。此外, 对照组野生型和突变体植株的平均鲜质量差异不显著, 野生型平均鲜质量为 4.81 g, *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株则分别为 4.69 g 和 4.75 g。处理组野生型植株的平均鲜质量为 3.75 g, *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>* 突变体植株的平



A. *ZmDIR11*的组织表达模式;B. 盐胁迫下玉米叶片中 *ZmDIR11*在不同时间的诱导表达模式。用200 mmol/L NaCl在不同时间(0、1、6、12、18、24、36、48 h)处理12日龄的野生型B73幼苗, *ZmActin1*作为对照。C. *ZmDIR11*蛋白定位于内质网中表达。融合载体 *ZmDIR11*-GFP、AtH2B-RFP以及 AtWAK-HDEL-RFP在烟草叶片中瞬时表达。A. Tissue expression pattern of *ZmDIR11*; B. Inducible expression pattern of *ZmDIR11* in maize leaves at different time points under salt stress. Wild-type B73 seedlings about 12 days old were treated with 200 mmol/L NaCl at different times (0, 1, 6, 12, 18, 24, 36, and 48 h). *ZmActin1* was used as an internal control. Error bars represent  $\pm$ SD ( $n=3$ ). C. *ZmDIR11* protein is expressed in the endoplasmic reticulum. Fusion vectors *ZmDIR11*-GFP, AtH2B-RFP, and AtWAK-HDEL-RFP were transiently expressed in tobacco leaves.

图2 *ZmDIR11*基因在玉米中的表达模式  
Fig.2 Expression pattern of *ZmDIR11* in maize

均鲜质量分别为1.67和1.32 g,差异极显著,突变体植株在盐胁迫下受到的生长抑制更严重,植株体内物质积累更缓慢(图3D)。同样,对照组野生型和突变体株系的平均干质量差异不显著,而在盐胁迫处理下, *ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株的平

均干质量分别为0.19和0.21 g,野生型植株的平均干质量则为0.36 g,突变体与野生型平均干质量差异极显著(图3E)。上述结果表明, *ZmDIR11*的突变使得植株在盐胁迫下受到的生长抑制情况显著高于野生型B73材料, *ZmDIR11*突变影响了玉米苗期植株的

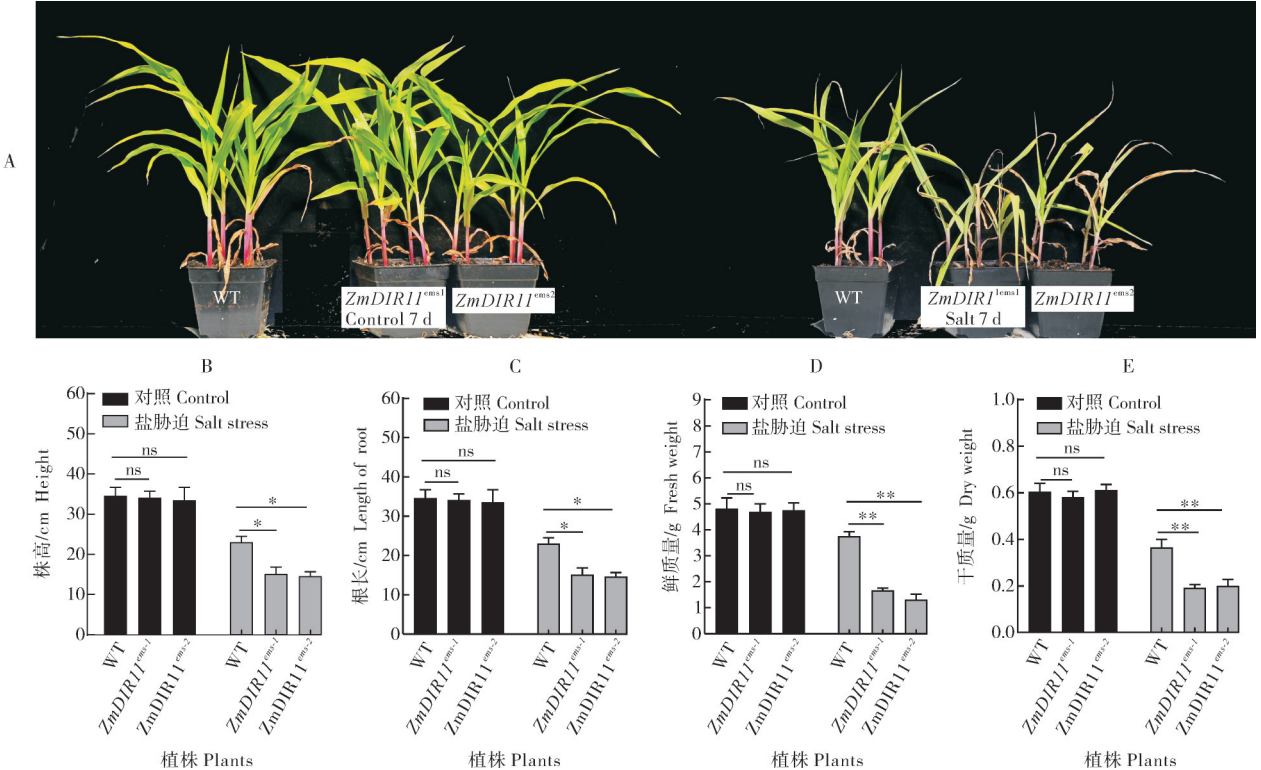


图3 对照组和盐胁迫处理组玉米的耐盐性表现  
Fig.3 The salt tolerance of maize between CK and salt stress treatments

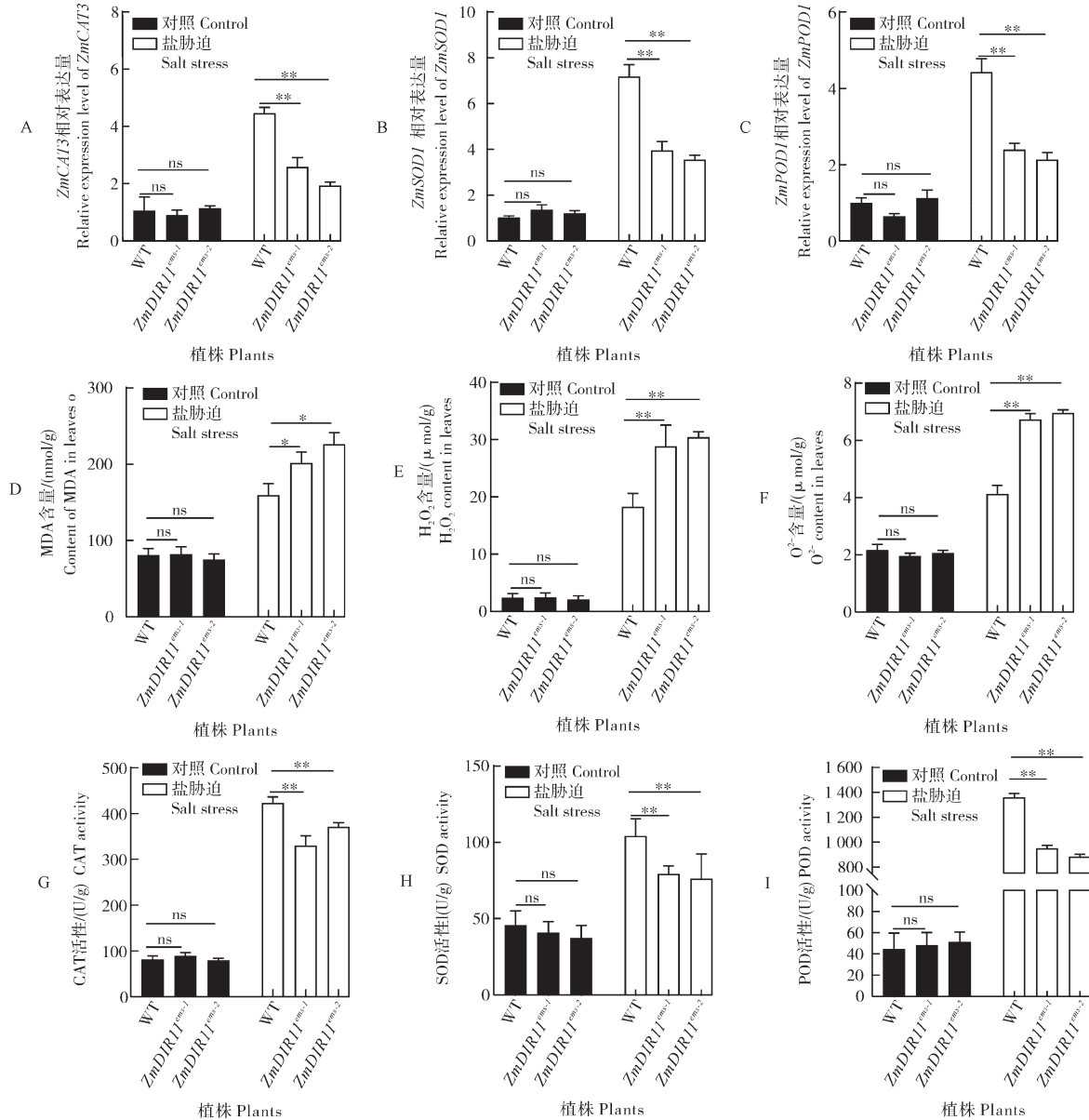
生长与干物质积累。

2.4 *ZmDIR11*对盐胁迫下玉米植株抗氧化能力的调控

为了解 *ZmDIR11* 是否能调控盐胁迫下玉米的氧化损伤代谢,利用 RT-qPCR 分析野生型 B73 植株和 *ZmDIR11<sup>ens</sup>* 植株在对照组和盐胁迫处理组 *ZmCAT3*、*ZmSOD1*、*ZmPOD1* (参与玉米体内抗氧化酶

防御通路) 基因的相对表达量并测定氧化相关生理指标。

对照组野生型和突变体叶片中 *ZmCAT3*、*ZmSOD1*、*ZmPOD1* 的相对表达量差异不显著;经过盐胁迫处理后,突变体植株叶片中的抗氧化酶防御通路中的 *ZmCAT1*、*ZmCAT3*、*ZmSOD1*、*ZmPOD1* 相对基因表达量极显著低于野生型(图 4A、B、C)。



12 日龄的玉米幼苗用 200 mmol/L NaCl 及 1/2 Hogland 处理 3 d 用于取样测定。A–C. 对照组和盐胁迫处理组抗氧化代谢相关基因 *ZmCAT3*(A)、*ZmSOD1*(B)、*ZmPOD1*(C) 的相对表达量分析;D–F. 盐胁迫下玉米叶片中 MDA(D)、 $H_2O_2$ (E) 和  $O_2^-$ (F) 含量;G–I. 盐胁迫下玉米植株 SOD(G)、CAT(H) 和 POD(I) 的活性。12-day-old maize seedlings were treated with 200 mmol/L NaCl and 1/2 Hogland for 3 days for sampling and determination. A–C. Analysis of the relative expression levels of antioxidant metabolism related genes *ZmCAT3* (A), *ZmSOD1* (B), and *ZmPOD1* (C) before and after salt stress treatment. D–F. Contents of MDA (D),  $H_2O_2$  (E) and  $O_2^-$  (F) in maize leaves under stress; G–I. Activities of SOD (G), CAT (H) and POD (I) in maize plants under salt stress.

图 4 对照组和盐胁迫处理组玉米植株抗氧化能力

Fig.4 The antioxidant capacity of maize plants between CK and salt stress treatments



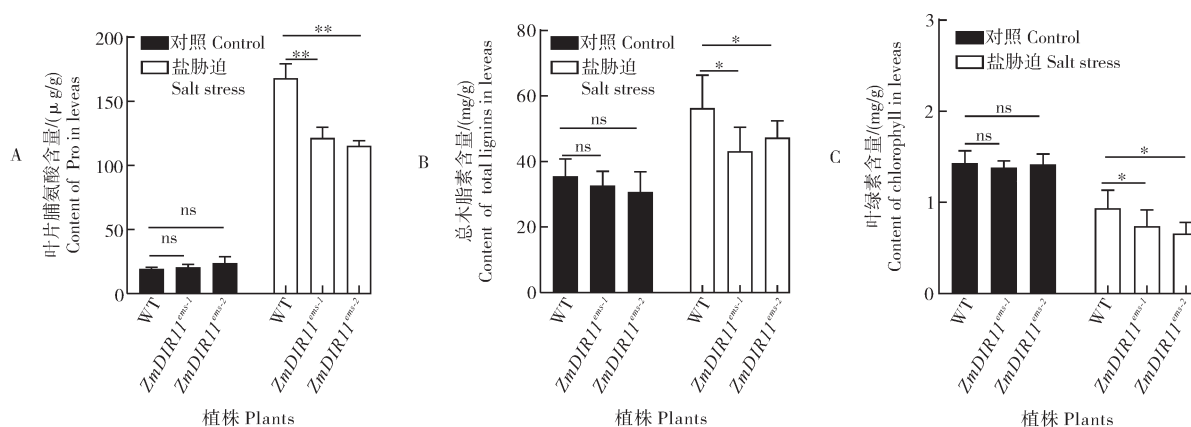
MDA、 $H_2O_2$ 以及 $O_2^{\cdot-}$ 的过度积累会损伤细胞膜,影响植物的生长,减弱植物对环境胁迫的响应能力。突变体植株的MDA、 $H_2O_2$ 以及 $O_2^{\cdot-}$ 的积累明显高于野生型。野生型植株、*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*和*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株的MDA含量分别为80.89、80.23和75.23 nmol/g,差异不显著。而在盐胁迫处理后,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株的MDA含量分别增加到201.70和226.32 nmol/g,而野生型植株MDA含量增加到159.07 nmol/g,突变体植株与野生型植株的MDA含量在盐胁迫处理后差异显著(图4D)。野生型植株叶片的 $H_2O_2$ 含量为2.38  $\mu\text{mol/g}$ ,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片中含量分别为2.42和2.07  $\mu\text{mol/g}$ ,差异不显著。盐胁迫处理后,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株的 $H_2O_2$ 含量分别上升为28.81和30.41  $\mu\text{mol/g}$ ,野生型植株叶片中的 $H_2O_2$ 含量为18.29  $\mu\text{mol/g}$ ,盐胁迫处理后突变体植株和野生型植株之间该指标差异极显著(图4E)。对照组野生型和*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片中的 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别为2.16、1.95和2.05  $\mu\text{mol/g}$ ,野生型植株与突变体植株之间 $O_2^{\cdot-}$ 含量差异不显著。经过盐胁迫处理后,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片中的 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别上升到6.73和6.95  $\mu\text{mol/g}$ ,野生型植株叶片中 $O_2^{\cdot-}$ 含量为4.12  $\mu\text{mol/g}$ ,突变体和野生型植株之间 $O_2^{\cdot-}$ 含量差异极显著(图4F)。表明*ZmDIR11*的突变导致细胞质膜的损伤程度加剧。盐胁迫引起的氧化损伤会导致活性氧(ROS)的积累。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)以及过氧化物酶(POD)在清除过量的ROS中发挥着重要作用。结果显示,对照组野生型和突变体的幼苗叶片中的CAT、SOD、POD活性差异不显著,其中野生型植株叶片中CAT酶活为81.25 U/g,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*与*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*的SOD酶活分别为88.91和79.23 U/g。野生型植株叶片中的SOD酶活为45.75 U/g,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*与*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*的SOD酶活分别为40.85和37.28 U/g。野生型植株叶片中的POD酶活为44.76 U/g,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*与*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*的SOD酶活分别为48.21和51.28 U/g(图4G-I)。在盐胁迫处理后野生型植株的CAT酶活性达到了422.56 U/g,而*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株分别只有330.17和370.98 U/g;野生型植株的SOD酶活性为104.23 U/g,而*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体的SOD酶活性分别为79.35和76.24 U/g;野生型植株的POD酶活性在处理后的达到了1 361.03 U/g,而

*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株分别为950.43和883.67 U/g。盐胁迫处理后突变体和野生型中的这3种酶活差异均极显著,*ZmDIR11*突变后导致突变体材料中的CAT、SOD以及POD的酶活均弱于野生型B73。这表明*ZmDIR11*通过刺激抗氧化防御酶的功能和降低活性氧水平,增强细胞抗氧化活性来提高玉米抵御盐胁迫的能力。

## 2.5 *ZmDIR11*对盐胁迫下玉米植株代谢物积累的影响

植物在盐胁迫条件下,其自身代谢物积累量会随着盐胁迫的程度而发生变化。结果显示,野生型植株叶片中的Pro含量为19.23  $\mu\text{g/g}$ ,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片中的Pro含量分别为20.56和23.78  $\mu\text{g/g}$ ,野生型和突变体Pro含量差异不显著。经过盐胁迫处理后,野生型植株叶片中的Pro含量积累达到了167.97  $\mu\text{g/g}$ ,而*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株中的Pro含量分别为121.48与115.29  $\mu\text{g/g}$ ,突变体植株与野生型Pro积累水平在盐胁迫处理后差异极显著。相较于野生型,突变体植株Pro的积累明显更少(图5A)。由图5B可见,对照组野生型和*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株总木脂素含量分别为35.47、32.65和30.67 mg/g。在盐胁迫处理下,所有玉米叶片中的总木脂素含量均有所增加,且*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体叶片中的总木脂素含量分别增加到43.13和47.28 mg/g,相较于野生型植株叶片中的56.28 mg/g,突变体株系的总木脂含量明显低于野生型。这可能是因为*ZmDIR11*参与木脂素的合成,利用木脂素的抗氧化活性来增强玉米的耐盐性。

突变体植株叶片叶绿素含量在处理后的下降得更多(图5C)。对照组野生型植株和*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片的叶绿素含量分别为1.43、1.38和1.41 mg/g,无显著差异。盐胁迫处理后野生型和突变体的叶绿素含量均有所降低,其中野生型植株叶片中的叶绿素含量为0.93 mg/g,而*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体植株叶片的叶绿素含量分别为0.73、0.65 mg/g,盐胁迫处理后突变体与野生型植株叶绿素含量差异显著。以上结果说明,*ZmDIR11*正向调节玉米中脯氨酸、木脂素的代谢积累过程,减弱了玉米叶片叶绿素的流失程度,正向调节玉米的抗盐胁迫能力。



用200 mmol/L NaCl处理12 d的玉米幼苗6 d,测定Pro(A)、总木脂素(total lignans)(B)和叶绿素(chlorophyll)(C)含量,在相同条件下用不含NaCl营养液处理的幼苗作为对照。12-day-old maize seedlings were treated with 200 mmol/L NaCl for 6 days, and then the Pro (A), total lignans (B) and chlorophyll (C) contents were measured.

图5 对照组和盐胁迫处理组玉米植株抗性相关代谢物的积累

Fig.5 The accumulation of resistant metabolites between CK and salt stress treatments

## 2.6 *ZmDIR11*对植株Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>转运及相关离子转运蛋白基因表达的影响

为探索*ZmDIR11*是否通过影响Na<sup>+</sup>与K<sup>+</sup>含量来调节玉米的耐盐性,测定了玉米叶片的Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>含量。结果显示,*ZmDIR11*突变体比野生型植株在盐胁迫下有着更多的Na<sup>+</sup>积累。对照组野生型植株叶片Na<sup>+</sup>含量为2.57 mg/g,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体叶片的Na<sup>+</sup>含量分别为2.61和2.49 mg/g,差异不显著。盐胁迫处理后*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体叶片的Na<sup>+</sup>含量分别增加到46.43和51.51 mg/g,相较于处理后的野生型植株叶片中的Na<sup>+</sup>含量(31.73 mg/g),突变体与野生型在盐胁迫处理后差异极显著(图6A)。*ZmDIR11*突变体比野生型植株在盐胁迫下的K<sup>+</sup>含量更低(图6B)。对照组野生型和*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体叶片的K<sup>+</sup>含量分别为48.37、46.88和50.66 mg/g,而在盐胁迫处理后,野生型植株叶片中的K<sup>+</sup>含量降低到35.16,*ZmDIR11<sup>ems-1</sup>*、*ZmDIR11<sup>ems-2</sup>*突变体叶片则分别降低到27.14和25.14 mg/g,此时突变体与野生型K<sup>+</sup>含量在盐处理后差异极显著。*ZmDIR11*的突变提高了突变体玉米幼苗体内的Na<sup>+</sup>含量和K<sup>+</sup>含量的比率(图6C)。

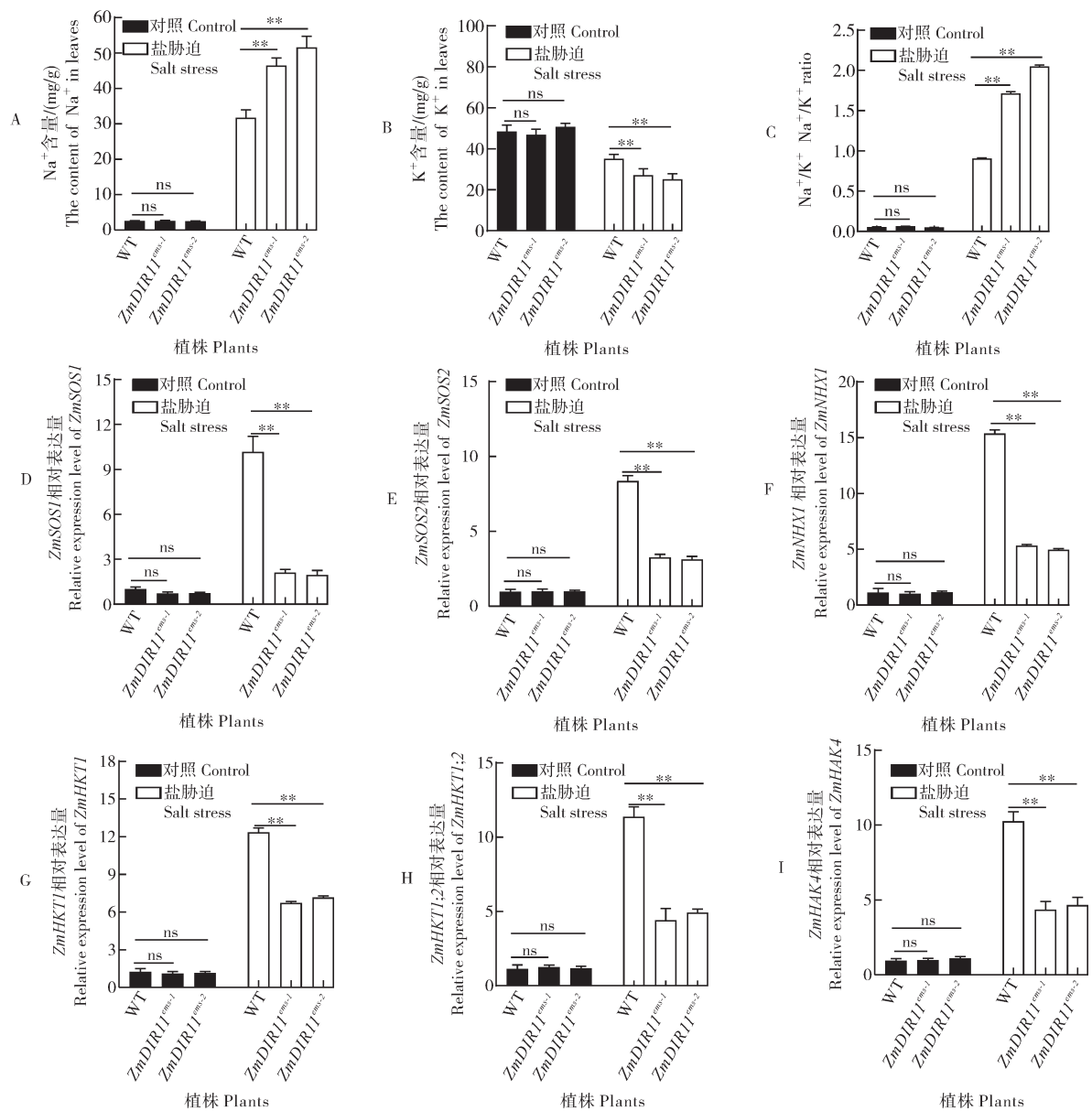
*ZmSOS1*<sup>[26]</sup>、*ZmSOS2*<sup>[27]</sup>、*ZmNHX1*<sup>[28]</sup>、*ZmHAK4*<sup>[29]</sup>、*ZmHKT1*<sup>[30]</sup>和*ZmHKT1;2*<sup>[31]</sup>是一系列编码Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>等离子转运的膜转运蛋白基因,利用RT-qPCR分析这些基因在对照组(盐胁迫处理前)和盐胁迫处理后的相对基因表达水平,发现对照组*ZmSOS1*、*ZmSOS2*、*ZmNHX1*、*ZmHKT1*、*ZmHKT1;2*

和*ZmHAK4*的相对表达量基本无差异,而在盐胁迫处理下,突变体植株与野生型植株叶片中的各基因相对表达量差异极显著(图D-I)。这说明*ZmDIR11*参与了调节离子转运方式来提高植物对盐胁迫的抗性。

## 3 讨论

*DIRs*基因是木脂素生物合成途径的重要成员,编码一类保守的Dirigent蛋白。目前,*DIRs*已被发现存在于多种植物中,一部分*DIRs*蛋白被发现可以参与(+)-棉子酚((+)-gossypol)<sup>[32]</sup>的合成以及凯氏带(asparianstrip)的形成<sup>[33]</sup>,另一部分则主要参与植物对生物及非生物逆境响应的生理过程。研究人员在西瓜中共鉴定出22个*DIRs*基因,并且通过实验发现抗性品种中*CIDIR5*和*CIDIR8*基因在接种白粉病菌后表达丰度明显上升,表明这2个*DIRs*基因可能参与了西瓜的抗病机制<sup>[34]</sup>。过表达*GmDIR22*能够提高大豆植株体内木脂素的总量,并增强大豆对疫霉的抗性,表明大豆*DIRs*基因也能够抵抗生物胁迫中发挥作用<sup>[35]</sup>。在对稻属的*DIRs*基因家族进行GWAS鉴定和表达模式分析时发现,接种立枯丝核菌后,*OsjDIR13*、*OsjDIR15*、*OsjDIR21*、*OsjDIR29*、*OsjDIR35*、*OsjDIR36*和*OsjDIR37*的表达受到显著抑制。并且*OsjDIR35*、*OsjDIR36*和*OsjDIR37*是串联重复基因,这意味着它们在调节水稻抗纹枯病方面可能发挥协同作用<sup>[36]</sup>。对芸薹属白菜品种的29个*DIRs*基因进行研究鉴定,发现*BrDIR2*能够对真菌产生响应,并且同时观察到11个*BrDIRs*对水淹处





用 200 mmol/L NaCl 处理玉米幼苗 6 d, 取第 2 片真叶干燥后测量 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 含量。在相同条件下用不含 NaCl 的营养液处理的幼苗作为对照。A. Na<sup>+</sup> 含量; B. K<sup>+</sup> 含量; C. Na<sup>+</sup> 含量与 K<sup>+</sup> 含量比。D-I. 离子转运相关蛋白基因在 *ZmDIR11<sup>ems</sup>* 植株中差异表达。Corn seedlings were treated with 200 mmol/L NaCl for 6 days, and the Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> contents were measured after drying the second true leaf. Seedlings treated with nutrient solution without NaCl under the same conditions served as controls. A. Content of Na<sup>+</sup>; B. Content of K<sup>+</sup>; C. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. D-I. Ion transport-related protein genes are differentially expressed in *ZmDIR11<sup>ems</sup>* plants.

图 6 对照组和盐胁迫处理组玉米植株 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 离子转运相关指标

Fig.6 Related indicators of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion transport in maize between CK and alt stress treatments

理、12 个 *BrDIRs* 对 ABA 处理和 12 个 *BrDIRs* 对冷胁迫处理产生响应性表达。表明白菜 *DIR* 基因家族成员既能在生物胁迫中发挥抗病作用也能对非生物胁迫产生响应<sup>[37]</sup>。在对藜苜蓿的 *DIR* 基因家族的 29 个 *MtDIRs* 进行非生物胁迫处理表达谱分析时发现, 不同基因成员在干旱、寒冷以及盐度等非生物胁迫处理下发生高表达<sup>[38]</sup>。而另一项对甘蔗属 *ScDir*s 基

因的研究中发现, *ScDir* 蛋白在大肠杆菌 Rosetta 菌株中表达后, 能增强转基因细菌对 PEG 和 NaCl 的耐受性<sup>[39]</sup>。

日前对玉米 *DIRs* 基因的研究较少, 我们前期从玉米中共鉴定出 40 个 *DIRs* 基因, 该家族部分成员包括 *ZmDIR11* 在干旱、低温、NaCl 以及水淹等胁迫下被不同程度地诱导表达。本研究结果表明, *Zm-*

*DIR11*在调控玉米耐盐性方面发挥了正调控作用。*ZmDIR11*蛋白定位于内质网中,其表达受盐胁迫诱导。*ZmDIR11*通过降低MDA和 $H_2O_2$ 的积累,增加Pro和总木脂素的代谢合成,缓解植物受到的细胞损伤,减弱渗透压、改善植株生长状态。盐胁迫可致使植物遭受氧化应激,并产生氧化损伤。SOD、CAT、POD是减轻氧化损伤的关键酶。*ZmDIR11*提高了这3种酶的活性,进而减轻了盐胁迫下的氧化损伤。离子毒性损伤是盐胁迫对植物的直接影响。高盐往往通过 $Na^+$ 的积累以及相应 $K^+$ 的流失,对渗透调节与光合作用产生影响。为探究*ZmDIR11*是否借由影响 $Na^+$ 含量来调控玉米的耐盐性,对盐胁迫下玉米的 $Na^+$ 含量进行了测定。在本研究中,*ZmDIR11*负向调控了 $Na^+$ 的积累。这表明*ZmDIR11*可能通过影响 $Na^+$ 的含量调控玉米的耐盐性。本研究发现*ZmDIR11*的突变会抑制叶绿素的合成,表明*ZmDIR11*可能通过影响叶绿素的合成参与抵抗盐胁迫的防御机制。利用RT-qPCR分析了盐胁迫下相关基因的表达,发现*ZmDIR11*不仅能影响相关抗氧化酶基因的表达,也能影响抗盐胁迫信号通路的关键基因*ZmSOS1*<sup>[26]</sup>的表达。这表明*ZmDIR11*可能参与玉米抗盐胁迫的信号传递,提高玉米内源抗盐基因的表达,从而提高玉米的耐盐性。

*DIRs*是参与木脂素合成的关键基因,本研究检测了对照组和盐胁迫处理组的总木脂素含量。结果显示在盐胁迫下,相比于未经盐处理的对照组,总木脂素含量有一定程度的上升,而*ZmDIR11*突变会相对降低总木脂素的含量,这表明*ZmDIR11*影响了木脂素的合成,可能利用木脂素的生物活性来响应盐胁迫。但是,玉米*ZmDIR11*所调控合成的木脂素种类还有待鉴定。一般来说,植物内质网细胞器是植物细胞代谢合成的主要器官之一,控制着大部分次级代谢物的组装合成,本研究中发现*ZmDIR11*的启动子区域存在大量和非生物逆境相关的启动子元件,其中MYB元件最多,而研究表明MYB转录因子是植物中最大的一类转录因子家族,其重要功能之一就是参与作物对非生物逆境的应答<sup>[40]</sup>。亚细胞定位显示*ZmDIR11*蛋白位于内质网中,意味着它参与了某种代谢物如木脂素的合成,通过修饰蛋白质或基因的表达来完成对盐胁迫的调控。木脂素是由两分子苯丙素衍生物(即C6-C3单体)聚合而成的天然化合物,而DIR蛋白正是聚合过程中耦合反应进行的关键条件。本研究仅发现*ZmDIR11*影响了玉米总

木脂素的代谢。在药材及木本植物中木脂素结构已超200种,涉及植物生长发育、植物免疫代谢、人类及动物医学等方面,不同结构的木脂素其理化性质差异很大。不同的植物中往往存在不同结构的木脂素,与其组成的单体结构及衍生物有关,进而影响植物的生理代谢活动。关于玉米中木脂素的研究较少见,对木脂素结构的鉴定及理化性质的分析尚未突破,在后续的研究中还有待进一步探索。

## 参考文献 References

- [1] 陈嵘峰,屠静韵,许学文,等.蔬菜作物盐胁迫响应及耐盐机制研究进展[J].中国蔬菜,2024(4):23-33. CHEN R F, TU J Y, XU X W, et al. Research progress on salt stress response and salt tolerance mechanism of vegetable crops[J]. China vegetables, 2024(4):23-33 (in Chinese with English abstract).
- [2] LIU H T, TANG X, ZHANG N, et al. Role of bZIP transcription factors in plant salt stress[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2023, 24(9):7893[2024-12-17]. <https://doi.org/10.3390/ijms24097893>.
- [3] FANG X, LI W, YUAN H T, et al. Mutation of ZmWRKY86 confers enhanced salt stress tolerance in maize[J]. Plant physiology and biochemistry, 2021, 167:840-850.
- [4] FU J Y, ZHU C Y, WANG C, et al. Maize transcription factor ZmEREB20 enhanced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant physiology and biochemistry, 2021, 159:257-267.
- [5] ZHANG C, MIAO Y D, XIANG Y, et al. Brassinosteroid-signaling kinase ZmBSK7 enhances salt stress tolerance in maize [J/OL]. Biochemical and biophysical research communications, 2024, 723: 150222 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150222>.
- [6] CHEN X J, HUANG Q S, ZHANG F, et al. ZmCIPK21, a maize CBL-interacting kinase, enhances salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. International journal of molecular sciences, 2014, 15(8):14819-14834.
- [7] ZHU M Y, LI Q X, ZHANG Y S, et al. Glycine betaine increases salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) by regulating  $Na^+$  homeostasis[J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13:978304 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978304>.
- [8] ERB M, KLIEBENSTEIN D J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy [J]. Plant physiology, 2020, 184(1):39-52.
- [9] DING Y H, WANG S S, DU W H, et al. Identification of germplasm and sugar transporter gene *ZmSWEET1b* associated with salt tolerance in maize[J]. Journal of plant growth regulation, 2023, 42(12):7580-7590.
- [10] MEI X P, ZHAO Z K, BAI Y, et al. Salt Tolerant gene 1 contributes to salt tolerance by maintaining photosystem II activi-

- ty in maize[J]. Plant, cell & environment, 2023, 46(6): 1833-1848.
- [11] 肖莹, 马瑞芳, 陈军峰, 等. 板蓝根抗病毒活性成分生物合成的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(11): 1908-1913. XIAO Y, MA R F, CHEN J F, et al. Advances in biosynthesis of antiviral active components of isatidis *Radix* [J]. Modernization of traditional Chinese medicine and materia medica-world science and technology, 2016, 18(11): 1908-1913 (in Chinese with English abstract).
- [12] PICKEL B, SCHALLER A. Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(19): 8427-8438.
- [13] KIM K W, MOINUDDIN S G A, ATWELL K M, et al. Opposite stereoselectivities of dirigent proteins in *Arabidopsis* and schizandra species [J]. Journal of biological chemistry, 2012, 287(41): 33957-33972.
- [14] 穰中文, 周清明. 水稻 dirigent 基因家族生物信息学分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(2): 111-120. RANG Z W, ZHOU Q M. Bioinformatic analysis of the dirigent gene family in rice[J]. Journal of Hunan Agricultural University (natural sciences), 2013, 39(2): 111-120 (in Chinese with English abstract).
- [15] 宋敏. 小麦 *JRL* 和 *DIR* 基因家族的鉴定与分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2013. SONG M. Identification and analysis of *JRL* and *DIR* gene families in wheat[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [16] LI X F, LIU Z L, ZHAO H Y, et al. Overexpression of sugarcane *ScDIR* genes enhances drought tolerance in *Nicotiana benthamiana* [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(10): 5340 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.3390/ijms23105340>.
- [17] PANIAGUA C, BILKOVA A, JACKSON P, et al. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure[J]. Journal of experimental botany, 2017, 68(13): 3287-3301.
- [18] XUE B P, DUAN W, GONG L P, et al. The *OsDIR55* gene increases salt tolerance by altering the root diffusion barrier[J]. The plant journal, 2024, 118(5): 1550-1568.
- [19] 米鑫. *ZmCDPK6* 参与玉米干旱胁迫应答的功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2021. MI X. Study on the function of *ZmCDPK6* in maize drought stress response[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [20] WOZNY M, SCHATTAT M H, MATHUR N, et al. Color recovery after photoconversion of H2B::mEosFP allows detection of increased nuclear DNA content in developing plant cells [J]. Plant physiology, 2012, 158(1): 95-106.
- [21] VERICA J A, HE Z H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family[J]. Plant physiology, 2002, 129(2): 455-459.
- [22] TEASDALE R D, JACKSON M R. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus[J]. Annual review of cell and developmental biology, 1996, 12: 27-54.
- [23] 张宇涵, 李星霖, 刘丽君, 等. 玉米转录因子 *ZmNAC59* 调控植物抗盐性[J]. 西北植物学报, 2024, 44(3): 381-395. ZHANG Y H, LI X L, LIU L J, et al. Transcription factor *ZmNAC59* regulates plant salt resistance in *Zea mays* L. [J]. Acta botanica boreali-occidentalia sinica, 2024, 44(3): 381-395 (in Chinese with English abstract).
- [24] 陈凤琼, 陈秋森, 林佳昕, 等. 番茄 *DIR* 基因家族鉴定及其对非生物胁迫响应的分析[J]. 中国农业科学, 2022, 55(19): 3807-3821. CHEN F Q, CHEN Q S, LIN J X, et al. Genome-wide identification of *DIR* family genes in tomato and response to abiotic stress[J]. Scientia agricultura sinica, 2022, 55(19): 3807-3821 (in Chinese).
- [25] MENGARELLI D A, ZANOR M I. Genome-wide characterization and analysis of the CCT motif family genes in soybean (*Glycine max*) [J/OL]. Planta, 2021, 253(1): 15 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03537-5>.
- [26] ZHOU X Y, LI J F, WANG Y Q, et al. The classical SOS pathway confers natural variation of salt tolerance in maize[J]. New phytologist, 2022, 236(2): 479-494.
- [27] LI J F, ZHOU X Y, WANG Y, et al. Inhibition of the maize salt overly sensitive pathway by *ZmSK3* and *ZmSK4* [J]. Journal of genetics and genomics, 2023, 50(12): 960-970.
- [28] HOU Y L, ZENG W Z, AO C, et al. *Bacillus atrophaeus* WZYH01 and *Planococcus soli* WZYH02 improve salt tolerance of maize (*Zea mays* L.) in saline soil [J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 891372 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.891372>.
- [29] ZHANG M, LIANG X Y, WANG L M, et al. A HAK family  $\text{Na}^+$  transporter confers natural variation of salt tolerance in maize[J]. Nature plants, 2019, 5(12): 1297-1308.
- [30] ZHANG M, CAO Y B, WANG Z P, et al. A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf  $\text{Na}^+$  exclusion and salt tolerance in maize[J]. New phytologist, 2018, 217(3): 1161-1176.
- [31] ZHANG M, LI Y D, LIANG X Y, et al. A teosinte-derived allele of an HKT1 family sodium transporter improves salt tolerance in maize[J]. Plant biotechnology journal, 2023, 21(1): 97-108.
- [32] LIN J L, FANG X, LI J X, et al. Dirigent gene editing of gossypol enantiomers for toxicity-depleted cotton seeds [J]. Nature plants, 2023, 9(4): 605-615.
- [33] WANG Y Y, CAO Y B, LIANG X Y, et al. A dirigent family protein confers variation of Casparian strip thickness and salt tolerance in maize [J/OL]. Nature communications, 2022, 13(1): 2222 [2024-12-17]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29809-0>.
- [34] YADAV V, WANG Z Y, YANG X Z, et al. Comparative anal-



ysis, characterization and evolutionary study of dirigent gene family in Cucurbitaceae and expression of novel dirigent peptide against powdery mildew stress[J/OL].*Genes*,2021,12(3): 326[202-12-17].<https://doi.org/10.3390/genes12030326>.

[35] LI N H, ZHAO M, LIU T F, et al. A novel soybean dirigent gene *GmDIR22* contributes to promotion of lignan biosynthesis and enhances resistance to *Phytophthora sojae* [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2017, 8: 1185[2024-12-17].<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01185>.

[36] DUAN W, XUE B P, HE Y Q, et al. Genome-wide identification and expression pattern analysis of dirigent members in the genus *Oryza* [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(8): 7189[2024-12-17].<https://doi.org/10.3390/ijms24087189>.

[37] THAMIL ARASAN S K, PARK J I, AHMED N U, et al. Characterization and expression analysis of dirigent family genes related to stresses in *Brassica* [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2013, 67: 144-153.

[38] SONG M, PENG X Y. Genome-wide identification and characterization of *DIR* genes in *Medicago truncatula* [J]. *Biochemical genetics*, 2019, 57(4): 487-506.

[39] GUO J L, XU L P, FANG J P, et al. A novel dirigent protein gene with highly stem-specific expression from sugarcane, response to drought, salt and oxidative stresses [J]. *Plant cell reports*, 2012, 31(10): 1801-1812.

[40] WANG X P, NIU Y L, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(11): 6125 [2024-12-17].<https://doi.org/10.3390/ijms22116125>.

Mechanism of *ZmDIR11* regulating resistance to salt stress in maize

ZHAO Zhixiong<sup>1</sup>, GUAN Yuan<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, GU Wei<sup>2</sup>, YU Diansi<sup>2</sup>, ZHENG Hongjian<sup>2</sup>, QIN Tao<sup>2</sup>

1.College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai University of Ocean, Shanghai 201306, China;  
2.Institute of Crop Breeding and Cultivation, Shanghai Academy of Agricultural Sciences/  
CIMMYT-China Special Maize Research Center/Shanghai Engineering Research Center of Specialty Maize/  
Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201403, China

**Abstract** The *ZmDIR11* gene, a member of the *DIR* gene family, was cloned from maize and its sequence of gene and structures of protein were predicted to mine key genes involved in regulating the resistance to salt stress in maize. The patterns of gene expression were analyzed to further investigate the regulatory mode of *ZmDIR11* in salt stress tolerance in maize B73-EMS mutants. The results showed that *ZmDIR11* encoded a peptide containing the Dirigent domain, and its promoter region contained structural elements including ARE, MYB, MYC, STRE, LTR, and MBS, all associated with the regulation of abiotic stress. *ZmDIR11* was predominantly expressed in maize roots and upregulated under salt stress, with subcellular localization in the endoplasmic reticulum. It was found that the growth and material accumulation of mutant maize plants after salt stress treatment were significantly lower than those of wild-type B73, and the regulation pathway of oxidative metabolism, the accumulation of proline, the synthesis of chlorophyll, the accumulation of lignin, and the transport pathway of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> were inhibited. Relevant metabolic indexes of mutant maize plants were significantly lower than those of wild-type B73. It is indicated that *ZmDIR11* positively regulates the metabolic pathway of salt tolerance in maize, and its mutation reduces the salt tolerance in maize.

**Keywords** maize; bioinformatics; *ZmDIR11*; *DIR* genes; salt stress; mechanism of salt tolerance

(责任编辑:张志钰)