

玉米二酰甘油激酶基因耐低温分析

王鑫琦 车欣洋 张海洋 王旭 李玉涵 赵硕
刘思贝 王雪贺缘 贺琳 徐晶宇

(黑龙江八一农垦大学农学院/黑龙江省现代农业栽培技术与作物种质改良重点实验室, 163319, 黑龙江大庆)

摘要 二酰甘油激酶(DGK)可催化二酰甘油生成磷脂酸,参与植物对多种非生物胁迫的响应。采用CRISPR/Cas9技术敲除玉米(*Zea mays* L.) *ZmDGK1* 基因,获得 *zmdgk1*^{CR} T₃ 代纯合株系(遗传转化受体为自交系B104),将3个 *zmdgk1*^{CR} 株系和B104进行低温胁迫处理,测定表型和生理指标。结果表明,3个 *zmdgk1*^{CR} 株系幼苗表现出较轻的叶片失绿、黄化和萎蔫现象;根系生长受到轻微抑制,根系总长较B104增加11.30%~16.17%。在活性氧、细胞膜损伤、抗氧化酶活性、渗透调节物质和光合色素相关指标中, *zmdgk1*^{CR} 株系与B104均存在显著差异。与B104相比, *zmdgk1*^{CR} 株系的O₂⁻含量降低24.61%~30.71%,丙二醛含量降低5.19%~18.18%,超氧化物歧化酶活性提高3.31%~19.88%,总叶绿素含量增加8.78%~27.23%。此外,通过对低温处理后 *zmdgk1*^{CR} 株系的叶片和根系进行DAB、NBT、H₂DCF-DA和PI染色,证实 *ZmDGK1* 基因缺失可减少活性氧积累、降低细胞膜损伤,同时提高玉米的抗氧化能力、渗透调节能力及光合色素积累,表明 *ZmDGK1* 基因对玉米幼苗耐低温性具有负调控作用。

关键词 玉米;二酰甘油激酶;基因编辑(CRISPR/Cas9);耐低温性;活性氧

玉米(*Zea mays* L.)起源于墨西哥南部及中美洲的危地马拉地区,现已成为全球最重要的粮食作物之一,兼具粮饲复合功能^[1],其营养成分丰富且用途广泛,全球需求持续上升。由于玉米原产于热带和亚热带地区,对低温耐受性差,尤其在生长初期对温度要求较高,低温胁迫是其生长发育过程中常遭遇的非生物胁迫^[2]。

二酰甘油激酶(DGK)作为一类特殊的磷脂激酶,能够催化二酰甘油(DAG)生成磷脂酸(PA)。研究^[3-5]表明, *DGK* 基因参与植物对低温胁迫的响应过程,在以拟南芥细胞构建的悬浮培养体系中,低温条件下磷脂酶C(PLC)/DGK信号途径被激活。该通路有助于在低温胁迫初期促使PA积累^[6-7]。针对拟南芥低温胁迫的研究^[8-9]证实, *DGK* 基因在植物低温响应机制中发挥作用,可调节三酰甘油(TAG)、DAG和PA的稳态。*AtDGK2*、*AtDGK3*和*AtDGK5*基因的缺失能够增强植物的耐低温能力,并减缓低温胁迫下PA的生成^[10]。

低温胁迫会导致玉米植株体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量积累,进而引发膜脂

过氧化,破坏细胞膜的结构与功能^[11]。植物可通过提升抗氧化酶活性来消除过量ROS造成的危害。因此,抗氧化酶活性的高低直接反映了植物应对逆境的能力,对研究植物在不同环境下的生长、发育及适应策略具有重要意义^[12]。在植物低温胁迫研究中,低温信号是植物感知和响应低温环境的关键信息载体。植物细胞可通过细胞膜上的受体感知低温^[13]。当环境温度降低时会触发一系列信号转导过程,其中,脂质信号传导在植物对低温的初级感知中发挥关键作用,能够触发并调节细胞激素信号^[14]。

本研究运用CRISPR/Cas9技术构建了 *ZmDGK1* 玉米突变体材料,并对其进行低温胁迫处理。通过测定幼苗存活率、植株形态以及抗性生理生化指标,综合分析其耐低温特性,从功能缺失角度进一步验证了 *ZmDGK1* 的功能,明确了 *ZmDGK1* 基因在植物低温胁迫反应中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以玉米自交系B104为对照材料,以通过

作者简介:王鑫琦,主要从事作物逆境生理及分子生物学研究, E-mail: wangxinqi202207@163.com

徐晶宇为通信作者,主要从事作物分子育种研究, E-mail: XujingyuHbau@163.com

基金项目:黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2020C007);黑龙江八一农垦大学三横三纵重点专项(ZDZX202101)

收稿日期:2025-03-03;修回日期:2025-04-27;网络出版日期:2025-10-29

CRISPR/Cas9 技术敲除 *ZmDGK1* 基因的玉米株系（遗传转化受体为 B104）为研究对象，开展相关试验。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米 *zmdgk1*^{CR} 突变体株系的创制 在 *ZmDGK1* 基因的编码序列（CDS）第 1 个外显子中选定靶点。使用 targetDesign 网站（<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>）设计靶点，靶点及其前间区序

列邻近基序（PAM）位点序列为 AGCTGGGTCG GTGTCTCGGCAGG。根据该靶点设计接头引物，单导向 RNA（sgRNA）靶点设计见图 1a。CRISPR/Cas9 载体经 *Bsa*I 限制性内切酶酶切后，与靶点接头进行 T₄ DNA 连接酶连接。连接产物转化大肠杆菌，通过菌液 PCR 鉴定后送至北京华大基因科技有限公司测序验证，筛选出正确的重组载体（重组示意图如图 1b 所示），并将其用于玉米遗传转化，

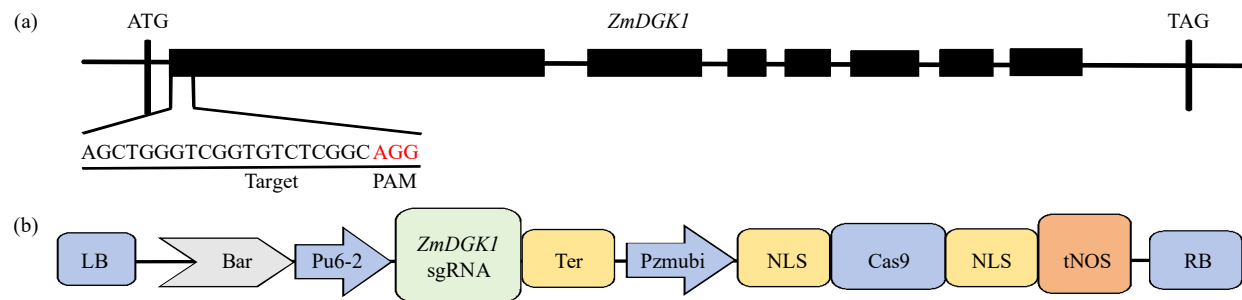


图 1 玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的创制
Fig.1 Creation of maize *zmdgk1*^{CR} lines

获得 T₀ 代基因编辑株系。

1.2.2 *zmdgk1*^{CR} 突变体的基因型鉴定与筛选 取幼苗新鲜叶片，采用 CTAB 法^[15]提取基因组 DNA。在 *ZmDGK1* 基因编辑靶点上下游约 200 bp 处设计特异性引物（*ZmDGK1* 靶点 F/R），以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，将 PCR 产物送至北京华大基因科技有限公司测序，将测序所得峰图上传至 DSDecode 网站进行解析，旨在分

析 *ZmDGK1* 靶点的编辑情况和突变类型，从而筛选 *ZmDGK1* 纯合突变体。

根据基因型分析结果，成功筛选出 3 个 *zmdgk1*^{CR} 纯合株系，分别为 *zmdgk1*^{CR}-1（缺失 6 bp）、*zmdgk1*^{CR}-2（缺失 2 bp）和 *zmdgk1*^{CR}-3（缺失 1 bp），基因编辑类型及测序结果见图 2a 和图 2b。将筛选出的纯合突变体繁育至 T₃ 代，用于后续分析。

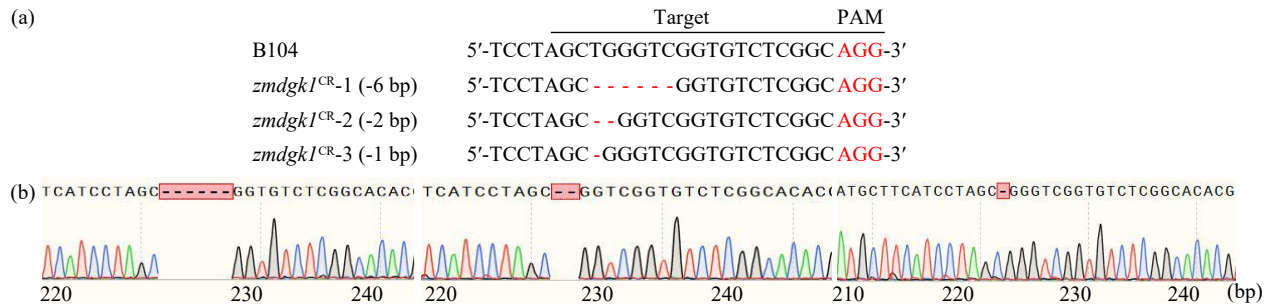


图 2 玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的基因型鉴定与筛选
Fig.2 Genotype identification and screening of maize *zmdgk1*^{CR} lines

1.2.3 低温胁迫处理 选取外观一致的玉米种子，置于 10% NaClO 溶液中消毒 30 min，用 ddH₂O 洗涤 5~10 次，在蒸馏水中浸泡 8 h。将蒸馏水浸湿的纱布铺于催芽盒内，把浸泡好的种子均匀摆放在纱布上，用湿润的纱布覆盖，后用保鲜膜密封盒口，放入人工气候箱（28 °C）。2 d 后挑选芽长一致的种子，使其芽朝上、根朝下，移植到土壤中，培

养至植株 3 叶 1 心。将在土壤中（25 °C）生长至 2 周的玉米幼苗置于 4 °C 下进行低温胁迫处理（ST），室温 25 °C 处理为对照（CK）。处理 4 d 时，测定表型和根系指标，并于玉米苗期叶片取样，用液氮快速冷冻后保存于 -80 °C 冰箱，用于后续生理指标的测定。之后常温恢复 2 d，观察并拍照记录植株生长状况。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 表型指标 于处理 4 d 时, 使用直尺测量玉米幼苗的株高和根系总长; 剪取地上部和地下部, 用滤纸吸干样品表面水分, 在分析天平上称量鲜重; 将地上部和地下部样品分别置于烘箱中, 105 °C 杀青 20 min, 80 °C 烘干至恒重, 再次称量干重。

1.3.2 根系指标 剪取处理 4 d 后的玉米植株根系, 使用 WinRHIZO 根系扫描仪扫描根系, 并分析根系相关指标^[16]。

1.3.3 ROS 积累水平 使用氮蓝四唑 (NBT) 和 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染液对叶片进行原位浸染, 检测 ROS 积累水平。采用比色法测定超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的含量。使用 DGK ELISA 试剂盒 (MM-6329302, 江苏酶免实业有限公司, 中国) 测定 DGK 活性。使用 NADPH ELISA 试剂盒 (MM-063102, 江苏酶免实业有限公司, 中国) 测定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (NADPH) 活性。

1.3.4 根尖 ROS 分布 取长约 1 cm 的根尖样品浸染于 10 μ mol/L 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (H_2DCF -DA) 染色液中, 黑暗条件下室温染色 10~15 min, 染色结束后, 用磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 和蒸馏水洗涤去除多余染液, 滤纸吸干后, 使用荧光光谱检测 (激发波长/发射波长=504/529 nm), 观察根尖 ROS (H_2DCF -DA) 分布并拍照。

1.3.5 抗氧化酶活性 采用紫外分光光度法^[17]测定超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性。

1.3.6 膜损伤指标 将叶片剪成条状, 测定并计算相对电导率^[16]。采用比色法测定丙二醛 (MDA) 含量。将长约 1 cm 的根尖样品浸染于 25 μ g/mL 碘化丙啶 (PI) 染色液中染色 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤去除多余染液后, 置于荧光显微镜下观察根尖细胞膜损伤情况并拍照, 激发波长为 535 nm, 发射波长为 615 nm。

1.3.7 渗透调节物质 取 0.5 g 叶片样品, 采用紫外分光光度法测定其脯氨酸 (Pro) 和可溶性蛋白 (SP) 含量^[18]。

1.3.8 光合色素含量 采用 95%乙醇浸染提取法测定玉米幼苗在吸光度 (OD) 为 470、649 和 665 nm 下的数据, 代入相应公式计算出叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量^[17]。

2 结果与分析

2.1 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系表型及生长指标的影响

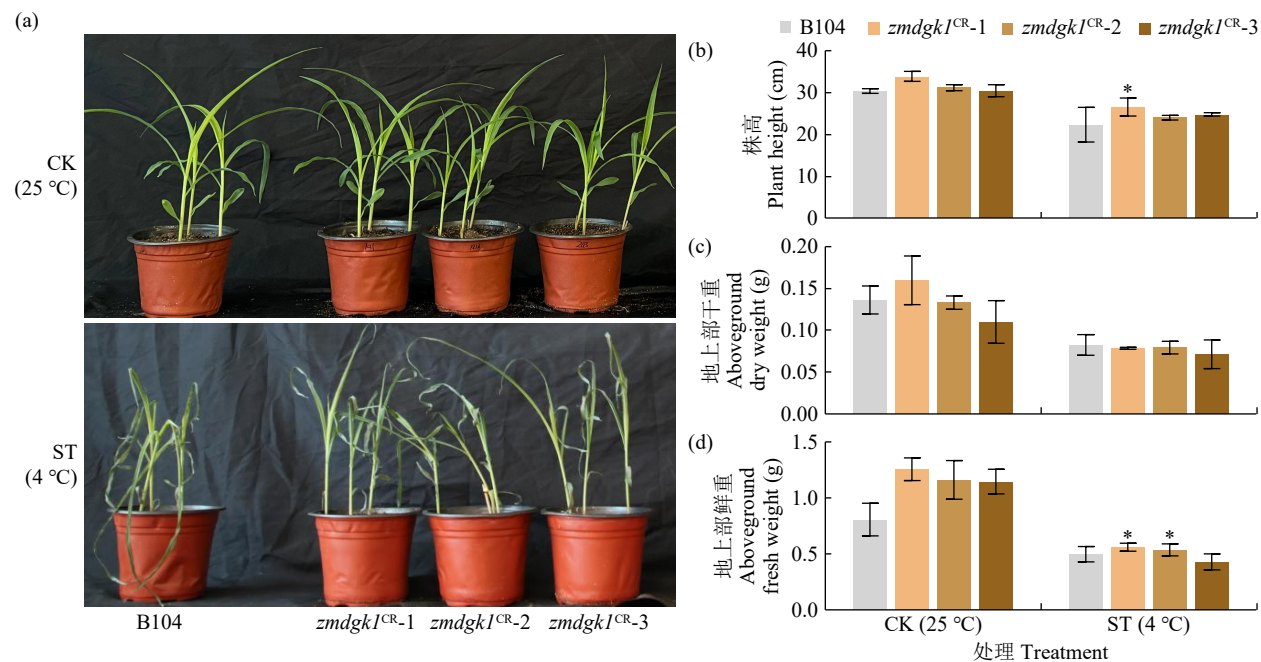
如图 3a 所示, 在 CK 处理下, 玉米 *zmdgk1*^{CR} 的 3 个株系与自交系 B104 的生长状况无明显差异; 在 ST 处理下, *zmdgk1*^{CR} 的 3 个株系玉米成苗表现出轻微的叶片失绿、黄化及萎蔫现象, 而 B104 的叶片则出现严重失绿且发生倒伏。对地上部各生长指标的测定结果显示, *zmdgk1*^{CR} 的 3 个株系在株高 (图 3b)、地上部干重 (图 3c) 及地上部鲜重 (图 3d) 方面均高于 B104, 表明 *ZmDGK1* 基因对玉米幼苗的耐低温性起负调控作用。

2.2 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系根系生长发育的影响

如图 4a 所示, CK 处理下玉米各株系根系生长无明显差异, ST 处理下各株系均受到抑制。与 B104 相比, 3 个 *zmdgk1*^{CR} 株系的长势更优, 受低温的影响较小。*zmdgk1*^{CR}-1、*zmdgk1*^{CR}-2 和 *zmdgk1*^{CR}-3 的根系总长较 B104 分别增长 16.17%、11.85% 和 11.30% (图 4b), 根表面积分别增加 12.53%、20.89% 和 20.25% (图 4c), 根体积分别增加 11.95%、18.89% 和 14.66% (图 4d)。结果表明, *ZmDGK1* 基因的缺失可增强玉米根系对低温的耐受性。

2.3 低温下 *ZmDGK1* 基因缺失对玉米株系 ROS 积累的影响

低温胁迫下, ROS 过度积累会导致植物细胞间的氧化还原状态失衡, 进而降低植物的耐低温能力。在 CK 处理下, 各株系叶片经 DAB (图 5a) 和 NBT (图 5b) 浸染后, 颜色无明显差异; 在 ST 处理下, 相较于 B104, 3 个 *zmdgk1*^{CR} 株系叶片的 NBT 和 DAB 染色均较浅。进一步测定了玉米各株系中 H_2O_2 (图 5c) 和 $O_2^{\cdot-}$ (图 5d) 的含量, 结果与染色情况一致。ST 处理下, 与 B104 相比, *zmdgk1*^{CR}-1、*zmdgk1*^{CR}-2 和 *zmdgk1*^{CR}-3 中 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别降低了 30.71%、24.61% 和 27.84%, H_2O_2 含量分别降低了 0.70%、12.92% 和 19.32%。DGK 活性测定结果如图 5e 所示, ST 处理下 *zmdgk1*^{CR}-1、*zmdgk1*^{CR}-2 和 *zmdgk1*^{CR}-3 较 B104 分别减少了 9.97%、10.88% 和 4.64%。NADPH 介导 ROS 组分 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 等的产生, ST 处理下 *zmdgk1*^{CR}-1、*zmdgk1*^{CR}-2 和 *zmdgk1*^{CR}-3 与 B104 相比分别减少了 13.18%、15.92% 和 23.44% (图 5f), 表明低温胁



“*”表示与同处理组中的自交系 B104 产生显著差异 ($P < 0.05$)。下同。
“*” indicates significant difference from inbred line B104 in the same treatment group ($P < 0.05$). The same below.

图 3 玉米 *zmdgk1^{CR}* 株系的耐低温表型及生长指标分析

Fig.3 Analysis of cold-tolerance phenotype and growth indexes of maize *zmdgk1^{CR}* lines

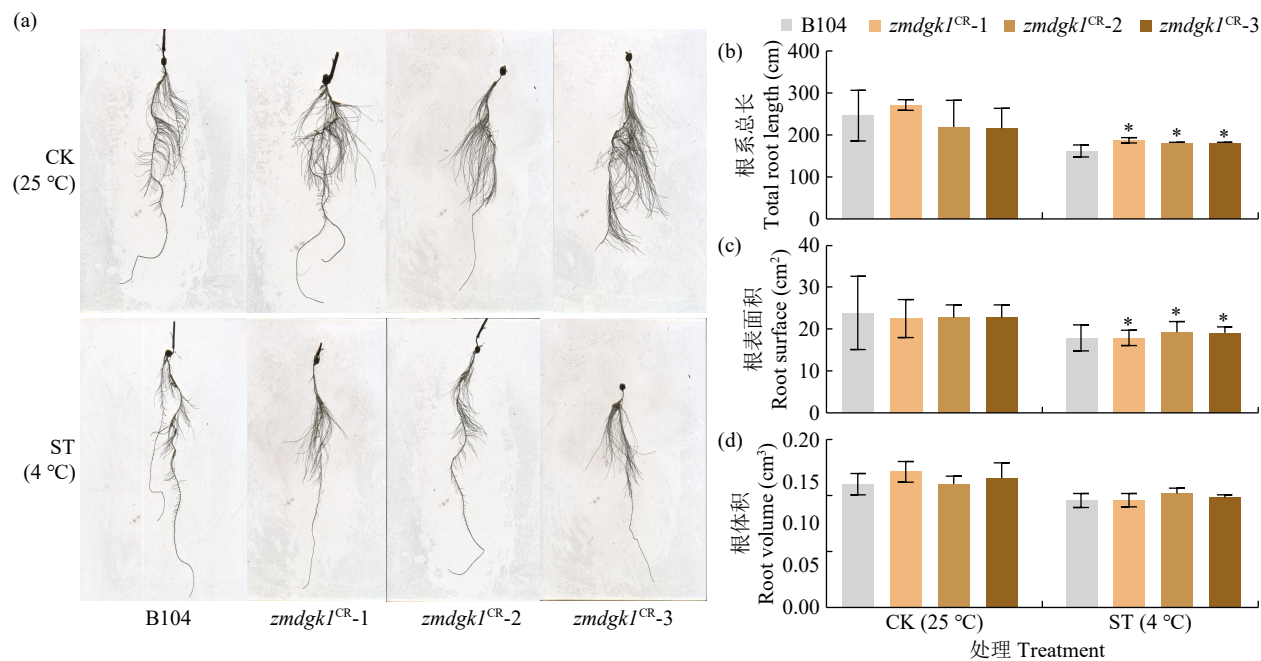


图 4 玉米 *zmdgk1^{CR}* 株系的根系形态指标分析

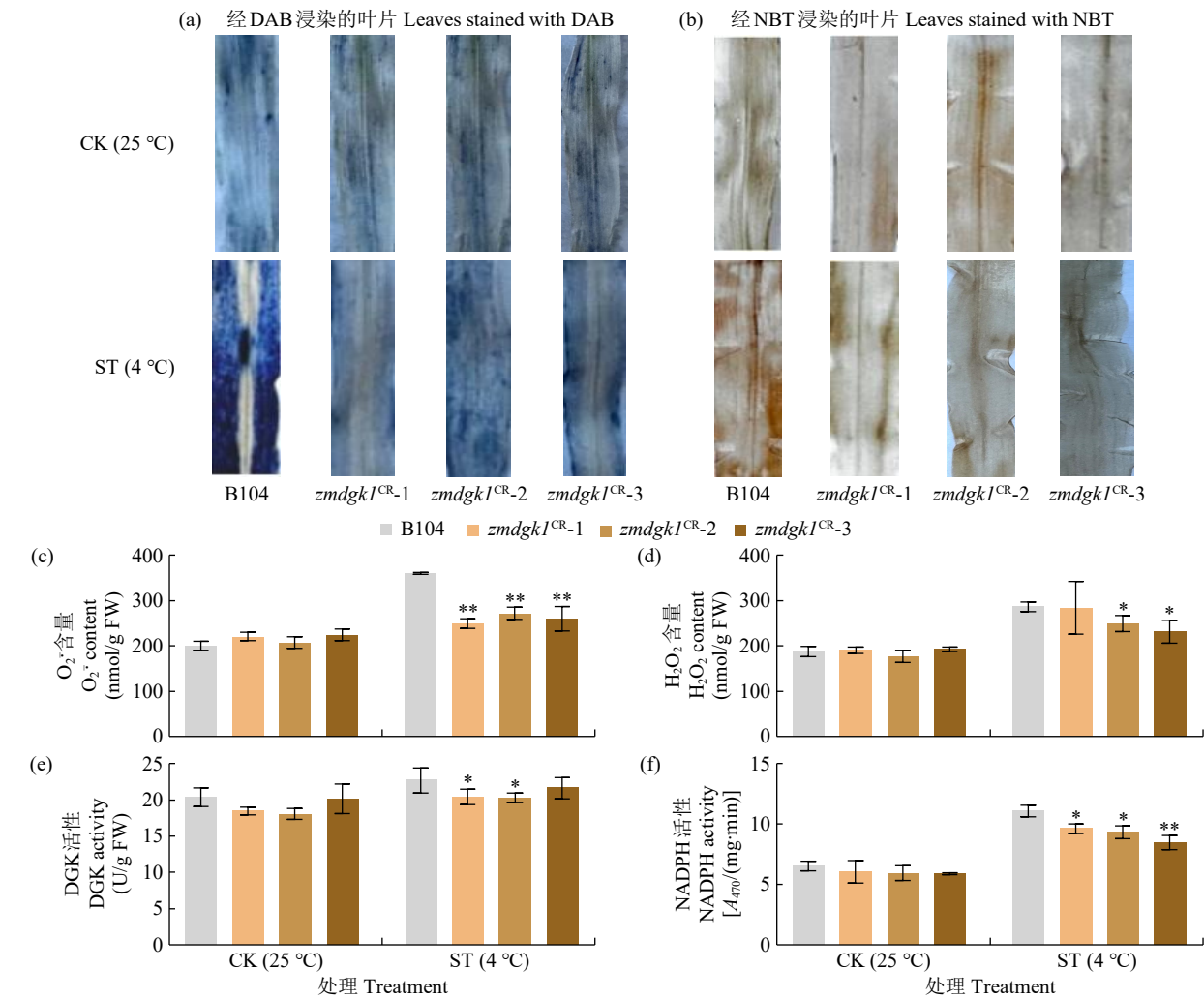
Fig.4 Analysis of morphological indexes of the root system of maize *zmdgk1^{CR}* lines

迫下 NADPH 活性的降低可能与 DGK 活性降低有关。综上，低温胁迫下 *ZmDGK1* 基因的缺失可减少 ROS 的积累。

2.4 低温对玉米 *zmdgk1^{CR}* 株系胚根 ROS 分布的影响

为进一步证实低温胁迫下 *ZmDGK1* 基因缺失

会减少 ROS 积累，将玉米自交系 B104 和 *zmdgk1^{CR}* 株系的胚根进行 H₂DCF-DA 染色，在荧光显微镜下观察各株系根尖的荧光强度。结果（图 6）显示，CK 处理下各株系玉米胚根的荧光强度均较弱，ST 处理下 *zmdgk1^{CR}* 各株系的荧光强度较 B104 更弱，表明低温条件下玉米 *zmdgk1^{CR}* 各株系胚根中的



“***” 表示与同处理组中的自交系 B104 产生极显著差异 ($P < 0.01$)。下同。
“***” indicates extremely significant difference from inbred line B104 in the same treatment group ($P < 0.01$). The same below.

图 5 *ZmDGK1* 基因缺失对玉米株系 ROS 积累及相关指标的影响
Fig.5 Effects of *ZmDGK1* gene deletion on ROS accumulation and related indexes in maize lines

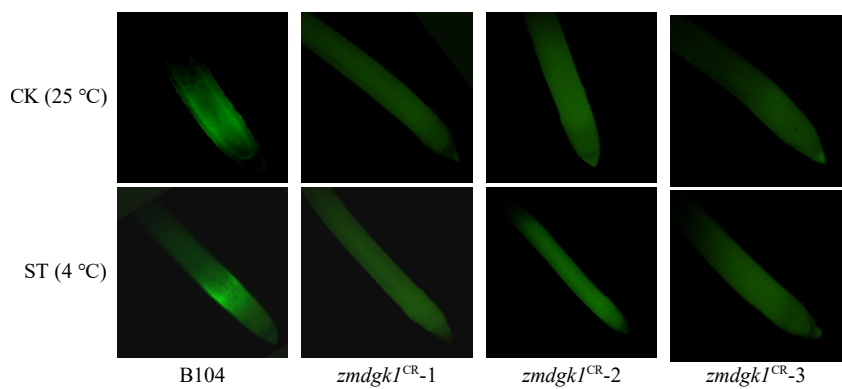


图 6 玉米 B104 和 *zmdgk1*^{CR} 株系的 ROS 分布
Fig.6 ROS distribution of maize B104 and *zmdgk1*^{CR} lines

ROS 积累较少。

2.5 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系抗氧化能力的影响

为探究低温条件下 *ZmDGK1* 基因缺失导致 ROS 积累减少是否与植株抗氧化能力有关，对玉

米 B104 和 *zmdgk1*^{CR} 株系的 SOD、POD、CAT 及 APX 活性进行测定。结果（图 7）显示，CK 处理下玉米各株系的抗氧化酶活性无显著差异，在 ST 处理下，*zmdgk1*^{CR-1}、*zmdgk1*^{CR-2} 和 *zmdgk1*^{CR-3}

均较 B104 有不同程度的升高, 其中 SOD 活性分别提高了 19.88%、10.37%和 3.31%, POD 活性分别提高了 1.12%、31.44%和 19.81%, CAT 活性分别

提高了 10.25%、25.17%和 4.53%, *zmdgk1*^{CR-1} 和 *zmdgk1*^{CR-3} 的 APX 活性分别提高了 11.26%和 14.18%。综上, 低温胁迫下 *ZmDGK1* 基因的缺失

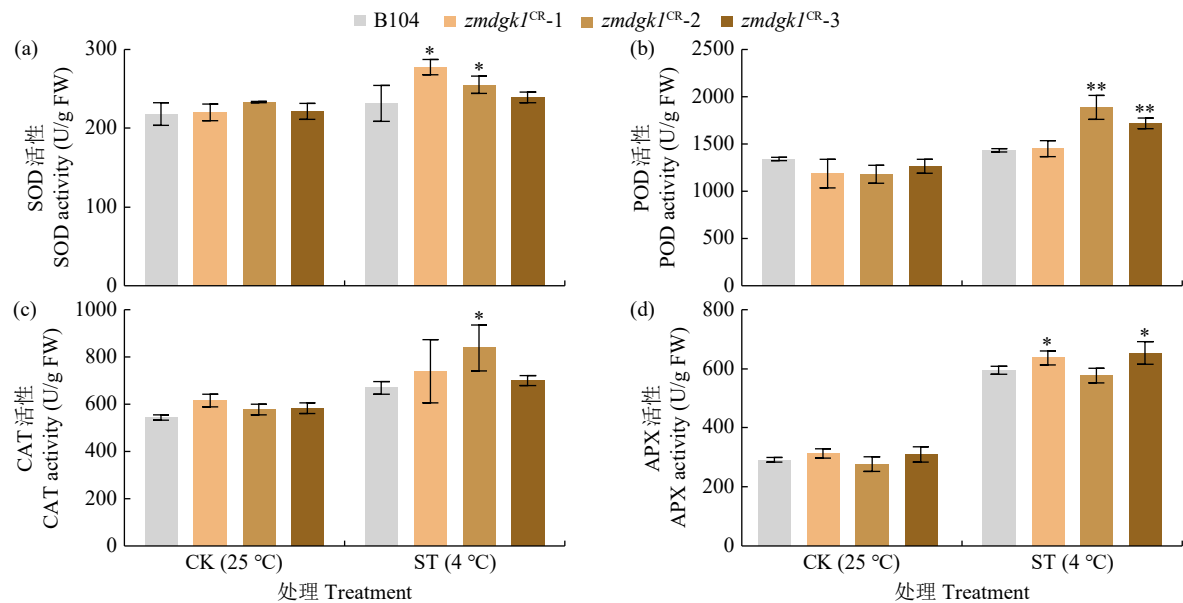


图 7 玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的抗氧化酶活性分析
Fig.7 Analysis of antioxidant enzyme activities of maize *zmdgk1*^{CR} lines

提高了玉米的抗氧化能力。

2.6 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的细胞膜损伤

相对电导率水平与 MDA 含量是衡量细胞膜氧化损伤的重要指标。玉米各株系的 MDA 含量 (图 8a) 和相对电导率 (图 8b) 在 CK 处理下均处于较

低水平, 表明细胞膜未受损伤; 反之, ST 处理下 2 个指标均出现不同程度的升高, 但 *zmdgk1*^{CR-1}、*zmdgk1*^{CR-2} 和 *zmdgk1*^{CR-3} 的 MDA 含量分别较 B104 低 6.49%、18.18%和 5.19%, 相对电导率分别低 26.14%、8.64%和 23.11%。各株系的根尖 PI 染色

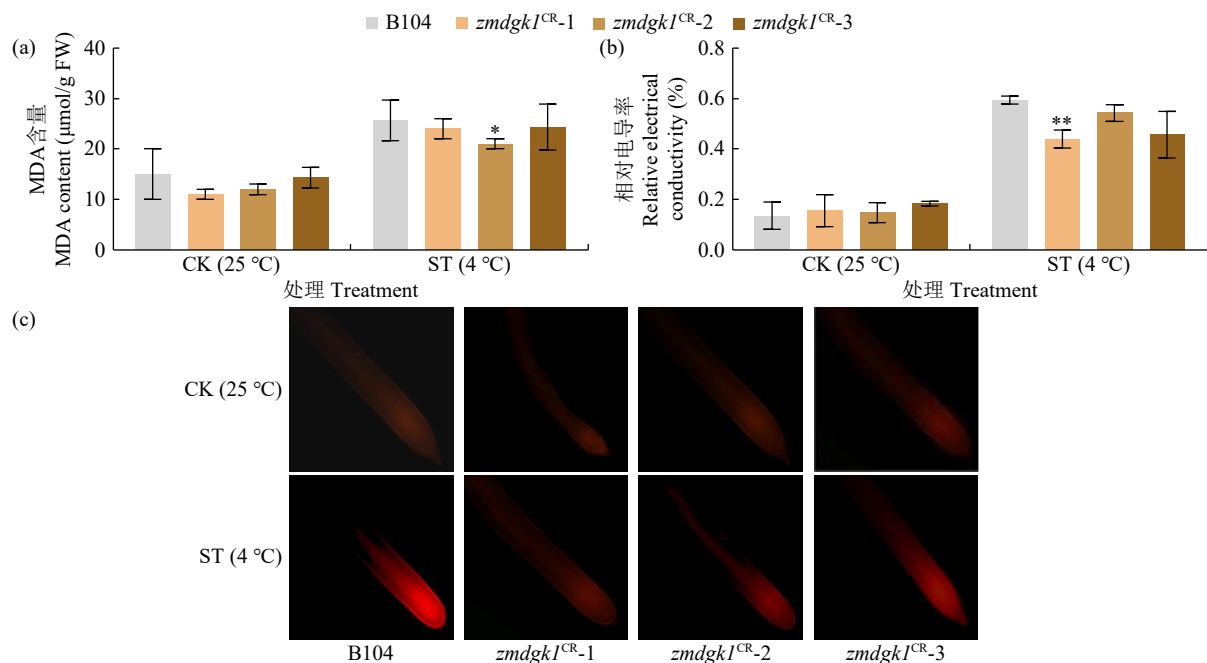


图 8 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系细胞膜损伤的分析
Fig.8 Analysis of cell membrane damage of maize *zmdgk1*^{CR} lines under low temperature

情况如图 8c 所示, ST 处理下各株系根尖颜色均加深, 但 *zmdgk1*^{CR} 各株系根尖着色较 B104 更浅, 染色部位更少。综上, *ZmDGK1* 基因的缺失可以降低玉米细胞死亡的发生程度以及细胞膜的损伤程度。

2.7 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系渗透调节物质含量的影响

如图 9 所示, ST 处理下, *zmdgk1*^{CR-1}、*zmdgk1*^{CR-2} 和 *zmdgk1*^{CR-3} 的 SP 含量与 B104 相比分别显著增

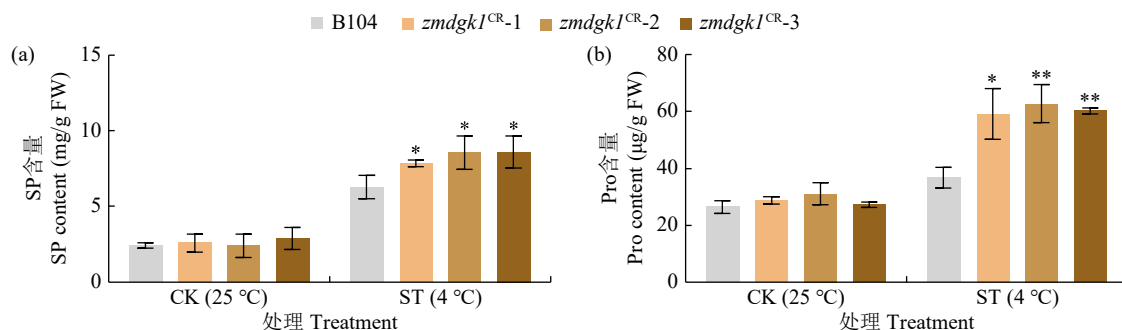


图 9 玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的渗透调节物质含量

Fig.9 Osmoregulatory substance content of maize *zmdgk1*^{CR} lines

加 24.99%、36.28%和 37.12%, Pro 含量分别显著增加 61.30%、70.98%和 64.04%。结果表明低温胁迫下 *ZmDGK1* 基因的缺失可增强玉米体内渗透调节作用, 提升植物细胞对低温的抗逆能力。

2.8 低温对玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系光合指标的影响

如图 10 所示, ST 处理下 *zmdgk1*^{CR-1} 和 *zmdgk1*^{CR-3} 与 B104 相比, 叶绿素 a 含量分别增加了

17.68%和 24.69%, 类胡萝卜素含量分别增加了 30.14%和 27.50%; ST 处理下 *zmdgk1*^{CR-1}、*zmdgk1*^{CR-2} 和 *zmdgk1*^{CR-3} 与 B104 相比, 叶绿素 b 含量分别增加了 60.07%、55.45%和 18.48%, 总叶绿素含量分别增加了 27.23%、8.78%和 23.29%。综上所述, *ZmDGK1* 基因的缺失对玉米植株在低温环境下的光合色素积累具有显著影响。

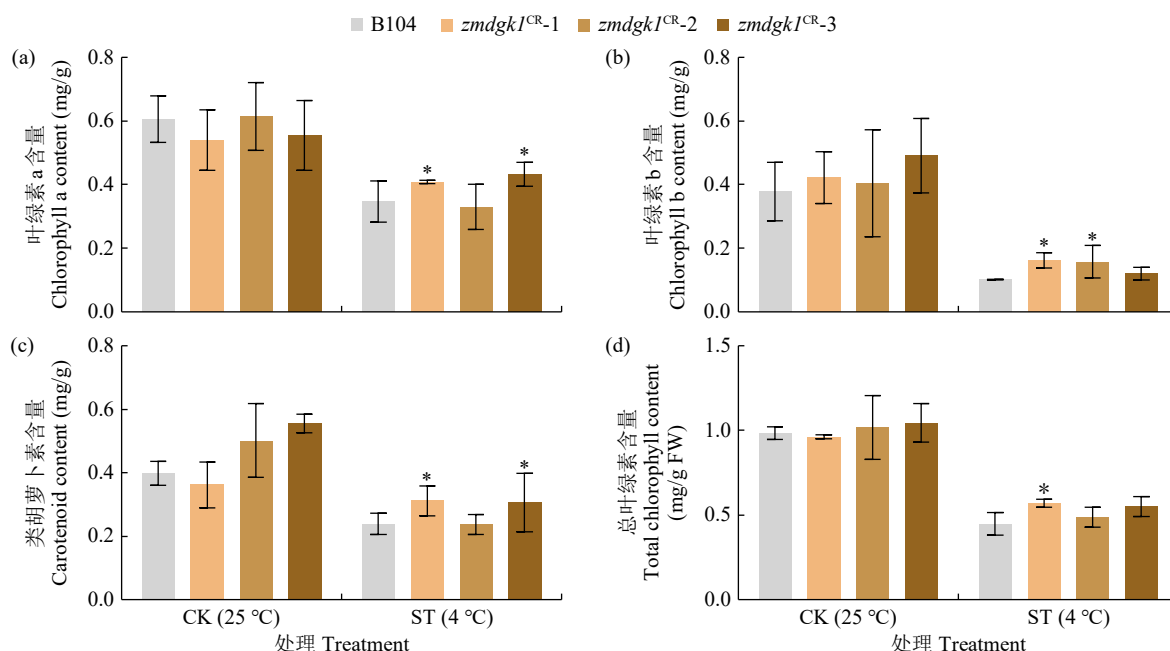


图 10 玉米 *zmdgk1*^{CR} 株系的光合指标分析

Fig.10 Analysis of photosynthetic indicators of maize *zmdgk1*^{CR} lines

3 讨论

CRISPR/Cas 基因编辑技术能够实现特定基因

的敲除、插入与替换, 从而精准高效地编辑基因组, 该技术已在农作物改良领域得到广泛应用^[19]。在实际应用中, 利用 CRISPR/Cas 对特定靶基因进

行突变,可影响植物对非生物胁迫的抗性。例如,在拟南芥中,利用 CRISPR/Cas9 敲除 *AtWRKY3* 及其同源基因 *AtWRKY4* 后,突变体对 ROS 的清除能力下降,对茉莉酸甲酯(MeJA)的敏感性增加,耐盐性降低^[20];敲除 *ARF4* 转录因子则提高了番茄的水分利用效率,敲除株系对盐和渗透胁迫的耐受性增强^[21]。本研究采用 CRISPR/Cas9 技术敲除玉米的 *ZmDGK1* 基因,证实 *ZmDGK1* 缺失可增强玉米的耐低温性,即 *ZmDGK1* 基因对玉米耐低温性起负向调控作用。

低温胁迫会致使植物体内 ROS 过度累积。在正常温度条件下,植物细胞内的自由基产生与清除处于相对平衡状态。此外,一定水平的 ROS 对细胞生长、增殖和分化不可或缺,同时其也是植物细胞信号转导过程中的关键信号分子。然而,ROS 过度积累会对植物造成不可逆的氧化损伤,严重时甚至引发细胞死亡^[22]。本研究发现,*ZmDGK1* 基因缺失可减少玉米幼苗在低温下的 ROS 积累,增强抗氧化酶活性,这可能是 *zmdgk1*^{CR} 突变体呈现耐低温表型的原因。ROS 爆发会引发植物膜脂过氧化,造成细胞膜损伤,导致 MDA 含量升高。本研究通过检测自交系 B104 和 *zmdgk1*^{CR} 株系的 MDA 含量和相对电导率,并进行 PI 染色,评估低温对不同玉米株系细胞膜的损伤程度。结果显示,*zmdgk1*^{CR} 各株系的 MDA 含量和相对电导率均低于 B104,表明 *ZmDGK1* 基因缺失能够降低玉米细胞死亡及细胞膜损伤程度。

早期针对拟南芥 DGK 响应非生物胁迫的研究^[23]表明,*AtDGK2* 受低温胁迫诱导,参与拟南芥的冷信号转导过程,拟南芥的 *dgk2*、*dgk3* 和 *dgk5* 敲除突变体表现出对低温耐受性的提升,同时 PA 产生量减少,ROS 生成降低,进一步增强了其对低温胁迫的耐受能力。另有研究^[24]发现,甘油二酯激酶 5 (DGK5) 和 PA 能与黄质醛脱氢酶 (ABA2) 相互作用,抑制其酶活性,从而抑制非生物胁迫下拟南芥中脱落酸 (ABA) 的生成。此外,*AtDGK1* 和 *AtDGK2* 在拟南芥的根和叶中显著表达,并在低温胁迫响应中发挥重要作用^[14]。DGK 基因响应植物耐低温性的机制,维持 TAG、DAG 和 PA 的稳态^[25]。因此,本研究在明确 *ZmDGK1* 响应低温胁迫功能的基础上,为阐释 DGK 及其产物 PA 在低温条件下的作用机制提供理论依据,对提高玉米的低温耐受性具有重要意义。

4 结论

采用 CRISPR/Cas9 技术敲除玉米 *ZmDGK1* 基因,获得了 *zmdgk1*^{CR} T₃ 代纯合突变株系。通过对比自交系 B104 与 *zmdgk1*^{CR} 突变株系在低温胁迫下的表型特征,发现低温处理后 3 个 *zmdgk1*^{CR} 株系的玉米幼苗叶片失绿、黄化及萎蔫程度轻于自交系 B104,根系生长受抑制程度同样较低。生理指标测定结果显示,*ZmDGK1* 基因缺失可降低玉米幼苗在低温下的 ROS 积累及细胞膜损伤,同时提高抗氧化酶活性、渗透调节能力及光合作用效率,增强玉米对低温胁迫的耐受性。

参考文献

- [1] Stitzer M C, Ross-Ibarra J. Maize domestication and gene interaction. *The New Phytologist*, 2018, 220(2): 395-408.
- [2] 于秋鸿,宋希云,李军. 玉米 *ZmGly* 基因不同非生物胁迫下的表达特性与 *ZmGly1* 基因的克隆. *玉米科学*, 2023, 31(6): 23-29.
- [3] Hernández I, Munné-Bosch S. Linking phosphorus availability with photo-oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(10): 2889-2900.
- [4] 张瑞敏,王三根,黄爱纓,等. 施磷水平对不同基因型玉米生理特性及膜保护酶的比较研究. *西南大学学报(自然科学版)*, 2008, 30(6): 60-63.
- [5] Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444-451.
- [6] Torres M A. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(4): 414-429.
- [7] Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, et al. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(9): 3903-3907.
- [8] Li W Q, Li M Y, Zhang W H, et al. The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology: The Science and Business of Biotechnology*, 2004, 22(4): 427-433.
- [9] Lee B H, Henderson D A, Zhu J K. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE₁. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 3155-3175.
- [10] Arisz S A, Wijk R V, Roels W, et al. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 1.
- [11] Ruelland E, Cantrel C, Gawer M, et al. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 999-1007.
- [12] Kidokoro S, Shinozaki K, Yamaguchi S K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses. *Trends in Plant Science*, 2022, 27(9): 922-935.
- [13] Chen Q F, Xu L, Tan W J, et al. Disruption of the *Arabidopsis* defense regulator genes *SAG101*, *EDS1*, and *PAD4* confers enhanced freezing tolerance. *Molecular Plant*, 2015, 8(10): 1536-1549.

- [14] Tan W J, Yang Y C, Zhou Y, et al. Diacylglycerol acyltransferase and diacylglycerol kinase modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress. *Plant Physiology*, 2018, 177(3): 1303-1318.
- [15] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 1985, 5(2): 69-76.
- [16] 邵文静, 张今杰, 盖胜男, 等. 低温胁迫下高粱幼苗叶片生理变化及相关基因表达分析. *农业生物技术学报*, 2021, 29(5): 857-870.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [18] Potocký M, Pejchar P, Gutkowska M, et al. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(16): 1654-1663.
- [19] Shu P, Li Y J, Sheng J P, et al. Tomato *SIMAPK3* modulates cold resistance by regulating the synthesis of raffinose and the expression of *SIWRKY46*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(10): 5185-5196.
- [20] Chen S Y, Zhang N, Zhang Q M, et al. Genome editing to integrate seed size and abiotic stress tolerance traits in *Arabidopsis* reveals a role for *DPA4* and *SOD7* in the regulation of inflorescence architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2695.
- [21] Bouzroud S, Gasparini K, Hu G J, et al. Down regulation and loss of *Auxin Response Factor 4* function using CRISPR/Cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress. *Genes*, 2020, 11(3): 272.
- [22] Gómez-Merino F C, Brearley C A, Ornatowska M, et al. *AtDGK2*, a novel diacylglycerol kinase from *Arabidopsis thaliana*, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(9): 8230-8241.
- [23] Xu J Y, Carlsson A S, Francis T, et al. Triacylglycerol synthesis by *PDAT1* in the absence of *DGAT1* activity is dependent on re-acylation of LPC by *LPCAT2*. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 4.
- [24] Li J W, Yao S B, Kim S C, et al. Lipid phosphorylation by a diacylglycerol kinase suppresses ABA biosynthesis to regulate plant stress responses. *Molecular Plant*, 2024, 17(2): 342-358.
- [25] Park M H, Ku K M, Do K R, et al. Carbon dioxide treatment modulates phosphatidic acid signaling and stress response to improve chilling tolerance and postharvest quality in paprika. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1287997.

Analysis of Low-Temperature Tolerance of Diacylglycerol Kinase Gene in Maize

Wang Xinqi, Che Xinyang, Zhang Haiyang, Wang Xu, Li Yuhan,
Zhao Shuo, Liu Sibe, Wang Xueheyuan, He Lin, Xu Jingyu

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Cultivation Technology and Crop Germplasm Improvement, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract Diacylglycerol kinase (DGK) catalyzes the conversion of diacylglycerol (DAG) to phosphatidic acid (PA), participating in plant responses to various abiotic stresses. This study employed CRISPR/Cas9 technology to knock out the *ZmDGK1* gene in maize (*Zea mays* L.), generating *zmdgk1^{CR}* T₃ homozygous lines (with inbred line B104 as the genetic transformation recipient). Three *zmdgk1^{CR}* lines and B104 were subjected to low-temperature stress, and their phenotypic and physiological indicators were measured. Results showed that the *zmdgk1^{CR}* seedlings exhibited less severe leaf chlorosis, yellowing, and wilting. Root growth was only slightly inhibited, with total root length increased by 11.30%-16.17% compared to that of B104. Analysis of low-temperature tolerance-related physiological indicators revealed significant differences between the *zmdgk1^{CR}* lines and B104 in parameters related to reactive oxygen species, cell membrane damage, antioxidant enzyme activity, osmotic regulators, and photosynthetic pigments. Specifically, the *zmdgk1^{CR}* lines exhibited a 24.61%-30.71% reduction in O₂⁻ content and a 5.19%-18.18% reduction in malondialdehyde content, while showing a 3.31%-19.88% increase in superoxide dismutase activity and an 8.78%-27.23% increase in total chlorophyll content. Furthermore, DAB, NBT, H₂DCF-DA, and PI staining of leaves and roots from *zmdgk1^{CR}* lines after low-temperature treatment confirmed that *ZmDGK1* gene deletion reduced reactive oxygen species accumulation and mitigated cell membrane damage, while enhancing antioxidant capacity of maize, osmotic regulation, and photosynthetic pigment accumulation. These findings collectively indicate that the *ZmDGK1* gene negatively regulates low-temperature tolerance in maize seedlings.

Key words Maize; Diacylglycerol kinase; Gene editing (CRISPR/Cas9); Low-temperature tolerance; Reactive oxygen species