文章编号：1005-0906(2026)01-0032-14 DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20260105

玉米耐低温相关*ZmICE6*基因分子特性分析与标记开发

许莹莹,鲍 迪,邸 宏,张 林,王振华,周 羽
(东北农业大学农学院,哈尔滨 150030)

摘 要：以课题组前期通过QTL分析挖掘到的玉米萌发期耐低温基因*ZmICE6*为研究对象,对其进行生物信息学分析,明确其具有bHLH保守结构域,启动子区域包含多种与非生物胁迫相关调控元件。在NCBI数据库中检索玉米基因组bHLH家族成员共71个,对家族基因构建进化树,明确该家族分为8个亚家族。*ZmICE6*与已知的耐低温基因*ZmICE1*亲缘关系最近,保守基序预测分析发现,共包含10个motif,其中motif 1、2较为保守,*ZmICE6*与*ZmICE1*具有3个相同的保守基序,分别为motif 1、2、5。以123份萌发期耐低温能力不同的玉米自交系为材料,扩增*ZmICE6*基因CDS区,检测到12个SNP和两个Indel,包含4个非同义突变SNP,其中非同义突变SNP380与萌发期相对根长(RRL)等5个指标极显著相关($P<0.01$),表型贡献率为7.47%～12.62%。针对SNP380位点开发了dCAPs标记DNCAP380,在123份玉米自交系、102份以掖478和齐319为亲本的RIL群体中进行验证,耐低温表型和基因型的符合率分别为76.92%和81.43%。

关键词：玉米;耐低温;*ZmICE6*基因;dCAPs分子标记
中图分类号：S513.035.3 **文献标识码**：A

Molecular Characterization and Marker Development of the Low-Temperature-Tolerant Related Gene *ZmICE6* in Maize

XU Ying-ying, BAO Di, DI Hong, ZHANG Lin, WANG Zhen-hua, ZHOU Yu
(*College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, China)

Abstract: *ZmICE6*, a cold tolerance gene during maize germination previously identified via QTL analysis by our research group, was subjected to bioinformatics analysis. The gene contains a conserved bHLH domain, and its promoter region harbors multiple regulatory elements associated with abiotic stress responses. Phylogenetic analysis of 71 maize bHLH members resolved eight sub-clades, with *ZmICE6* forming a maximally supported clade alongside the known cold-tolerance regulator *ZmICE1*; both share conserved motifs 1, 2 and 5. To link sequence variation to phenotype, the complete CDS was amplified from 123 inbreds that span the full spectrum of germination-stage cold vigor. Twelve SNPs and two InDels were recovered, including four non-synonymous changes. Non-synonymous SNP380 showed genome-wide significant associations($P<0.01$) with five germination traits—most prominently relative root length—and explained 7.47%-12.62% of phenotypic variance. A dCAPS marker(DNCAP380) designed to track the SNP380 allele achieved 76.92% and 81.43% genotype - phenotype concordance in the original diversity panel and in a 102-line Ye478 × Qi319 RIL population, respectively. DNCAP380 provides breeders with a codominant, cost-effective tool for marker-assisted fixation of cold-resilient *ZmICE6* haplotypes.

Key words: Maize; Low temperature tolerance; *ZmICE6*; dCAPs molecular marker

录用日期：2025-03-18
基金项目：东华北春玉米区早熟高产抗逆宜机收新种质创制与应用(2021YFD1201001)、黑龙江省自然科学优秀青年基金项目(YQ2022C009)
作者简介：许莹莹,硕士,主要从事玉米遗传育种研究。Tel:17320103837 E-mail:xuyingying0822@163.com
周 羽和王振华为本文通信作者。
E-mail:zhouyu0924@126.com E-mail:zhenhuawang_2006@163.com

玉米(*Zea mays* L)属于温度敏感型作物,整个生育期对温度要求较高[1]。玉米遭遇低温会导致生长受到限制,影响形态建成,甚至植株死亡[2]。目前已发现一些参与植物低温胁迫应答的转录因子如bHLH、AP2/ERF、NAC、WRKY等[3-6]。ICE转录因子能够选择性地与*CBF/DREB1*基因启动子中的MYC顺式作用元件相互作用,进而激活*CBF*基因的表达。CBF蛋白与冷响应基因*COR*的CRT/DRE启动子模块发生特异性结合,从而触发*COR*基因的转录,增强植物的耐低温能力。通过代谢组学与GWAS联合分析,确认转录因子*ZmICE1*在调控玉米耐低温机制中的关键作用。*ZmICE1*能够直接调控*DREB1*基因的转录活性,调节氨基酸代谢与活性氧含量;同时*ZmICE1*的靶基因*ZmAS*能够编码Glu/Asn合成途径的关键酶,在氮代谢调控中具有重要作用。低温环境下,ZmICE1蛋白表达量增加,一方面提高了响应低温胁迫相关基因*DREB1*等的转录;另一方面,通过抑制*ZmAS*基因表达,影响Glu/Asn的合成,从而减轻由Glu诱导的线粒体活性氧MtROS的积累,消除MtROS对DREB1的负向调控,提高玉米耐低温性[7]。前人挖掘到玉米中与水稻COLD1同源的*ZmCOLD1*,并明确了其生物学功能,发现其SNP2738显著提高了玉米耐低温能力。ZmCOLD1定位于质膜和内质网上,并与G蛋白ZmCT2的α亚基相互作用,在细胞核中与ZmLanCL蛋白相互作用。ZmCOLD1蛋白的表达引发了细胞外Ca^{2+}的内流,提高了ABA含量,降低了GA3和IAA含量。*ZmCOLD1*在萌发期通过调控ABA通路和光合作用途径提高玉米耐低温能力。本课题组前期通过QTL分析等方法挖掘到*ZmICE6*等玉米萌发期耐低温相关基因[8],其具体功能和调控机制尚未解析。

1　材料与方法

1.1　试验材料

来源广泛且耐低温性等级不同的123份玉米自交系,这些自交系来源和遗传背景不同,其耐低温性本课题组前期已经完成[9];102份掖478(耐低温自交系)×齐319(低温敏感自交系)为亲本的RIL群体家系,以上材料均由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.2　试验方法

1.2.1　*ZmICE6*基因的生物信息学分析

通过NCBI检索*ZmICE6*基因相关序列,针对*ZmICE6*基因及其前2000 bp左右的序列进行生物信息学分析,生物信息学分析软件见表1。

表1　生物信息学软件

Table 1　Bioinformatics software

序 号 No.	分析内容 Analysis content	在线软件 Online software
1	蛋白二级结构预测	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred
2	保守结构域预测	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/ cdd/wrpsb.cgi/
3	蛋白跨膜结构	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
4	信号肽预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
5	启动子元件预测	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
6	MEME在线软件	https://meme-suite.org/meme/tools/meme
7	Pfam在线软件	http://pfam.xfam.org/

1.2.2　*ZmICE6*基因dCAPS标记开发与验证

根据挖掘出的SNP,以突变位点为中心向两侧延伸约50 bp,通过dCAPS Finder分析最佳酶切位点,确保引物错配率为0。通过Snap Gene软件扩增序列并检索,酶切位点需保证单一性,引物序列如下:

SNP380-F:5'-CGCTCGATCGTGCAGATGG-3'

SNP380-R:5'-TGACGCGCCGCGGCGGCGGC-TAG-3'

扩增产物经电泳确定条带大小正确后,通过胶回收纯化产物用于酶切验证,酶切反应体系如下:

PCR产物	15 μL
ddH_2O	2.7 μL
10×NEB Buffer	2.0 μL
NheI	0.3 μL

使用金属浴37 ℃恒温过夜酶切,酶切结束后,吸取5 uL产物,通过3%浓度的琼脂糖凝胶电泳进行验证。

2 结果与分析

2.1 *ZmICE6*基因的生物学特性分析

2.1.1 *ZmICE6*基因结构分析

*ZmICE6*基因蛋白质二级和三级结构预测表明，其编码的氨基酸序列主要形成α-螺旋结构，占比为52.30%，无规卷曲占37.66%，延伸链区占7.95%，β-折叠占2.09%，无其他类型的二级结构。

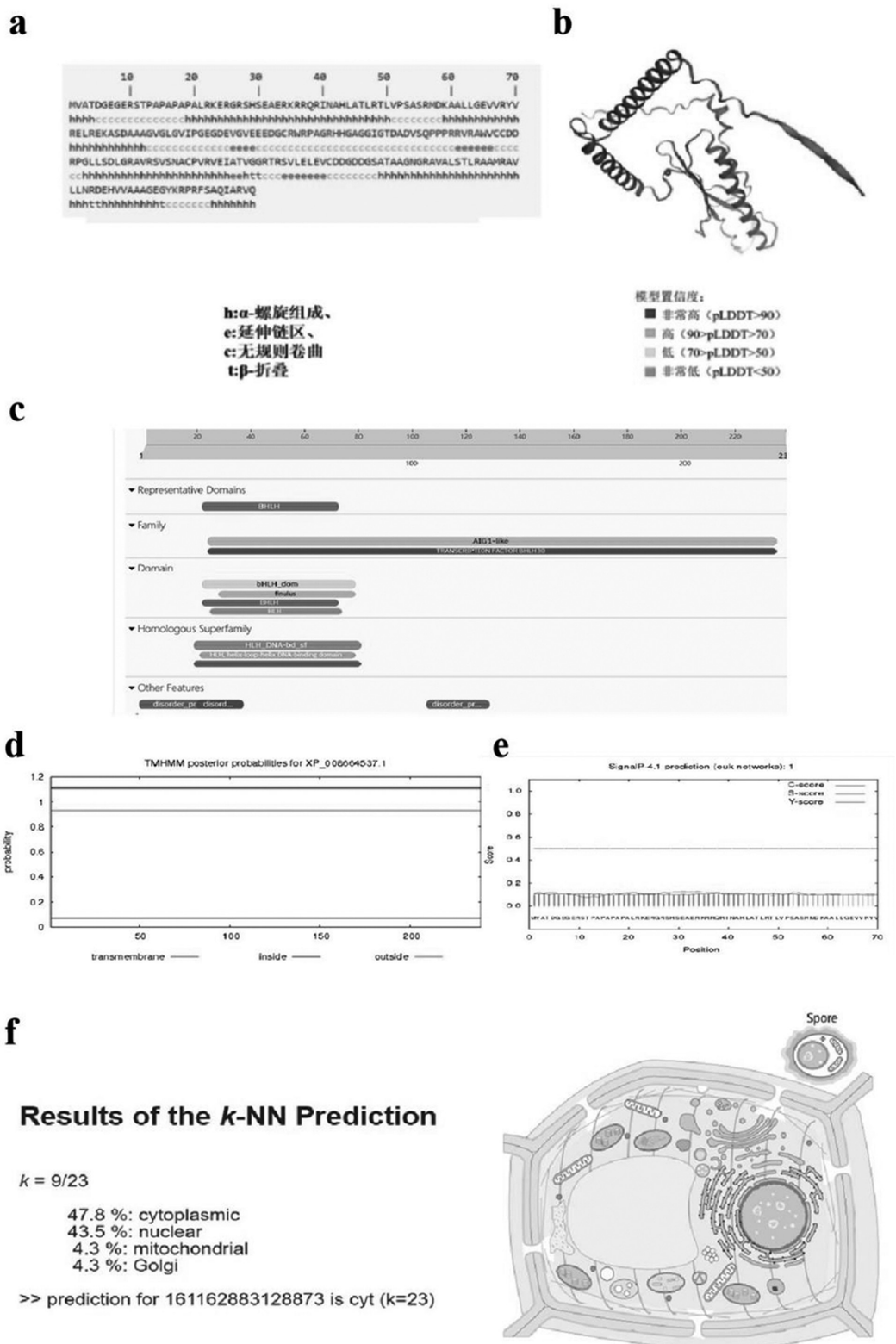


图1 *ZmICE6*基因结构分析

Fig.1 *ZmICE6* structure analysis

利用InterPro在线网站预测ZmICE6蛋白的保守结构域,该蛋白具有bHLH家族保守结构域,N端富含碱性氨基酸残基,HLH区域由两个α-螺旋通过一个非螺旋的环结构连接而成,参与多种转录调控过程。通过生物信息学网站预测,ZmICE6蛋白无跨膜特性,是非跨膜蛋白。对该蛋白信号肽预测结果表明,C值(剪切位点值)为0.110,无显著信号肽序列,说明该蛋白非分泌性蛋白。ZmICE6蛋白亚细胞定位于细胞质(图1)。

2.1.2　*ZmICE6*基因所在bHLH家族分析

通过NCBI筛选玉米bHLH的两个亚家族bHLH-SF superfamily以及bHLH-AtAMS中的基因,根据系统发育分析,两个家族中共71个基因,可被划分为8类。基因聚类结果表明,最大的一类含有

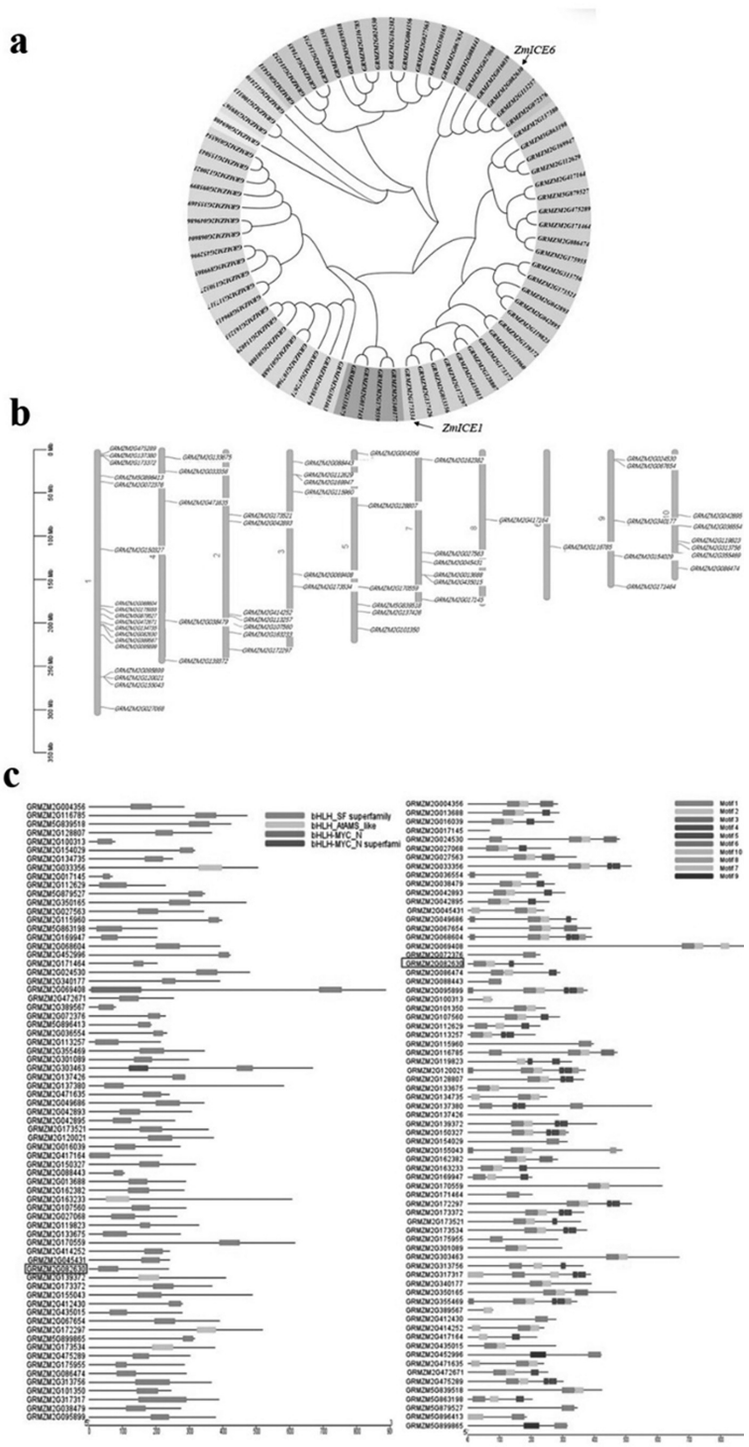


图2　*ZmICE6*基因的bHLH家族分析

Fig.2　bHLH family analysis of the *ZmICE6*

24个基因，包括已知的耐低温基因*ZmICE1*，相邻分支由*ZmICE6*与其他5个基因组成，两个基因具有较近的亲缘关系(图2)。染色体定位分析发现，bHLH家族基因分布在玉米10条染色体上，*ZmICE6*基因定位于玉米1号染色体的bin 1.07区域。对*ZmICE6*基因及玉米bHLH家族相关基因的蛋白序列进行motif分析，共鉴定到10个基序，其中motif 1、motif 2在绝大部分基因中存在，出现顺序相对固定；66个基因中仅有4个基因不含motif1，具有一定的保守性；motif 7和motif 9分别出现在不同的两个基因中，具有相对特异性。已知的耐低温相关基因*ZmICE1*除较为保守的两个motif外，还具有motif 4和motif 5；*ZmICE6*基因同样具有motif 1、motif 2、motif 5。

2.2 *ZmICE6*基因遗传变异分析

2.2.1 *ZmICE6*基因片段的扩增与序列分析

扩增123份不同耐低温等级的玉米自交系的*ZmICE6*基因CDS区序列，并进行遗传变异分析。这些自交系来源和名称各异，蕴含了不同地域、不同遗传背景的基因资源，是挖掘耐低温基因的基础。结果显示，*ZmICE6*基因在第二个外显子内存在大量突变(图3)。

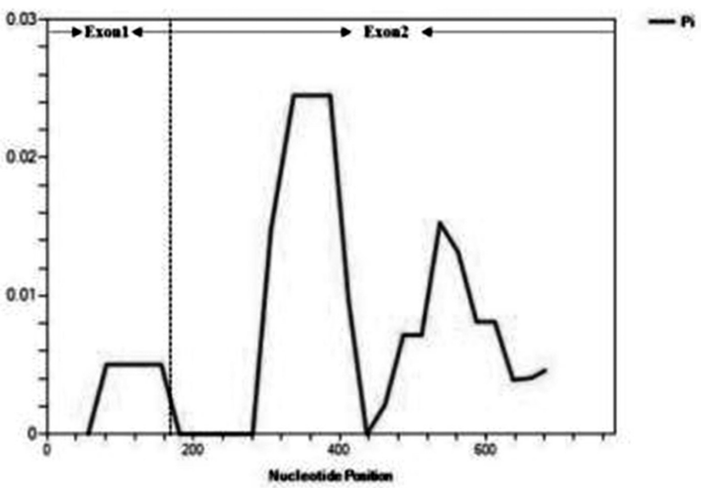


图3 *ZmICE6*基因核苷酸多样性

Fig.3 Nucleotide diversity of *ZmICE6*

2.2.2 *ZmICE6*基因编码区单体型分析

在CDS区共检测到12个SNP，分别位于124、339、354、360、372、380、508、528、576、585、587、678位置上，以及两个Indel位于35-40和325-330位置

表2 *ZmICE6*基因CDS区SNP、Indel及单体型

Table 2 SNP, Indel and haplotype in CDS region of *ZmICE6*

单体型 Haplotype	SNP位置 SNP position												Indel 位置 Indel position	
	124	339	354	360	372	380	508	528	576	585	587	678	35-40	325-330
HAP1	G	C	C	A	C	G	G	C	T	G	A	A	CGCCGG	----------
HAP2	T	C	C	A	C	G	G	C	T	G	A	A	----------	----------
HAP3	T	T	A	C	G	T	G	T	C	G	A	G	----------	GCAGGT
HAP4	G	T	A	C	G	T	G	T	C	G	A	G	----------	GCAGGT
HAP5	T	C	C	A	C	G	A	C	T	C	G	G	----------	----------
HAP6	G	T	A	C	G	T	G	C	C	G	A	G	----------	GCAGGT
HAP7	G	C	C	A	C	G	G	C	C	G	A	A	----------	----------
HAP8	T	C	C	A	C	G	G	C	C	G	A	A	----------	----------
HAP9	G	C	C	A	C	G	A	C	T	C	G	G	----------	----------
HAP10	T	T	A	C	G	T	G	C	T	G	A	G	----------	----------
HAP11	G	C	C	A	C	G	G	C	T	G	A	A	CGCCGG	GCAGGT
HAP12	G	C	C	A	C	G	G	C	C	G	A	G	----------	----------

上(表2)。利用DNA SPv6.0软件,根据核苷酸变异的类型和数量,对多态性位点进行分类,共鉴定出12种单体型,其多态性指数为0.833 7。其中,主要单倍型HAP3、HAP4、HAP5和HAP7占据了供试样本的77.24%,其他单倍型属于稀有变异(表3)。HAP3由36份自交系组成,主要包括中耐低温和低温高度敏感的材料;HAP4由22份耐低温或中耐低温材料构成;HAP5由18份自交系组成,主要包括中耐和高感材料;HAP7由19份自交系组成,包括中耐和高感材料。基于上述结果,初步认为HAP3中包含36份中耐低温级别以上材料,属于优异单倍型。

表3　*ZmICE6*单体型对应的自交系

Table 3　*ZmICE6* haplotype corresponding inbred lines

单体型 Haplotype	自交系份数(份) No. of inbred lines	自交系 Inbred line
HAP1	7	旱21、吉477、5213、自495、PI42、沈501、塔5
HAP2	2	材11-8、自330
HAP3	36	旱23、丹988、吉412、吉419、吉842、77、获唐黄17、旱8-3、485、D185、杂C546、416、吉495、吉001、D387、吉1037、丹黄02、绥系605、四-434、PI10、独321、鲁2548、丹904、辽2345、辽6082、3189、郑58、K10、郑28-1、中451、中黄64、888-9、绥系707、中黄68、812、郑28-2
HAP4	22	89-1、关17、196、374、M502、LX9801、四-287、黄C、吉465、L237、7165-1、吉046、辽5114、新自153-2、丹360、丹340、铁9010、DH34、吉81162、金黄76、5311、PI36
HAP5	18	SH15、金黄59、金黄55、丹599、沈137、中黄204、吉002、H3、吉A-034、7379-2、515、N528-1、郑30、吉803、CML206、7884、PH4CV、5公
HAP6	3	CN165、CN4379、吉8415
HAP7	19	川273、丹1324、四-419、Mo113、汶黄、特70、J9206、新自218、东46、CA90、吉818、甸11、CA335、莫群17、B84、7995-2、B104、PH6WC、CWF
HAP8	1	Y7
HAP9	1	沈136
HAP10	1	丹黄25
HAP11	8	C649、CN962、PI143、唐四平头、黄野四3、冀35、郑29、四-387
HAP12	5	京7、7537-1、H10、红玉米、双105

2.2.3　*ZmICE6*基因核苷酸多样性分析

依据耐低温能力的不同等级进行划分,并对各等级材料的核苷酸多样性与单倍型多样性进行分析(表4)。在123份玉米自交系材料中,3份高耐低温材料的核苷酸多样性π值为0.010 27,Hd值为1.000;5份耐低温材料的π值为0.007 00,Hd值为0.900;87份中耐材料的π值为0.006 40,Hd值为0.773;21份高感材料的π值为0.003 84,Hd值为0.824。

表4　*ZmICE6*基因的核苷酸多样性分析

Table 4　Nucleotide diversity analysis of the *ZmICE6*

材料耐低温性 Materials resistance to low temperature	份数(份) Portion	核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity	单倍型多样性(Hd) Haplotype diversity
高耐低温	3	0.010 27	1.000
耐低温	5	0.007 00	0.900
中耐低温	87	0.006 40	0.773
低温敏感	7	0.006 67	0.905
低温高度敏感	21	0.003 84	0.824
全　部	123	0.007 21	0.834

2.2.4 *ZmICE6*基因氨基酸水平变化分析

在上述变异位点中，共存在4个非同义SNP(表5)，SNP124和SNP587分别由丙氨酸(A)和天冬酰胺(N)突变为丝氨酸(S)，SNP380的丝氨酸(S)和SNP508的缬氨酸(V)突变为异亮氨酸(I)。

表5 非同义突变的SNP对应的氨基酸变化

Table 5 Non-synonymous mutation SNP corresponding amino acid changes

SNP物理位置 SNP position	氨基酸位置 Aminoacid position	氨基酸变化 Aminoacids changes	碱基突变 Nucleotide mutation
124	42	A/S	GCC/TCC
380	127	S/I	AGC/ATC
508	170	V/I	GTC/ATC
587	196	N/S	AAC/AGC

2.3 *ZmICE6*基因的dCAPS标记开发与验证

2.3.1 *ZmICE6*基因与玉米耐低温性的关联分析

结合本实验室前期获得的萌发期耐低温表型结果，将*ZmICE6*基因CDS区中变异位点与萌发期耐低温表型进行关联分析，结果见表6。表型贡献率最高的SNP位点为SNP339，但该位点为同义突变，未引起氨基酸变化。SNP380碱基突变类型为AGC变为ATC，对应氨基酸由丝氨酸(S)突变为异亮氨酸(I)，且与萌发期耐低温相关的5个性状(相对根长、相对活力指数、相对简易活力指数、相对根表面积和相对根体积)显著关联(P<0.01)，其中SNP380的贡献率为7.47%～12.62%，选择该位点进行dCAPS标记开发。

表6 *ZmICE6*基因CDS的序列变异与玉米耐低温性关联分析结果

Table 6 Association analysis results of *ZmICE6* coding sequence variations with maize cold tolerance

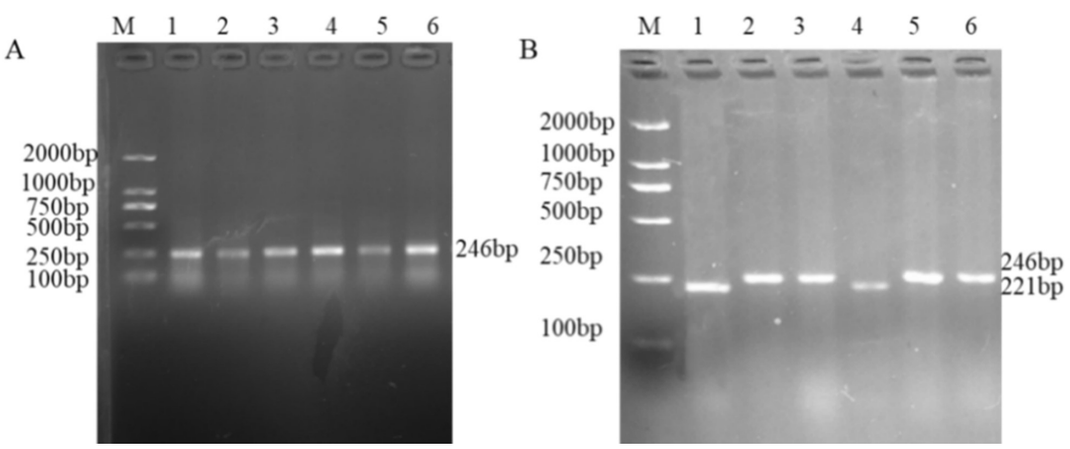
标 记 Marker	等位基因 Allele	P值 P-value	F值 F value	自交系数 No. of inbred lines	R^2(%)	性 状 Trait
SNP339	C/T	7.26E-06	21.991 607 70	61/62	15.38	RRL
	C/T	1.08E-05	21.100 083 50	61/62	14.85	RSVI
	C/T	4.85E-05	17.764 036 00	61/62	12.80	RRSA
	C/T	8.47E-05	16.552 250 10	61/62	12.03	RVI
	C/T	0.000 203 53	14.679 210 10	61/62	10.82	RGL
	C/T	0.000 270 84	14.076 808 80	61/62	10.42	RRV
	C/T	0.001 588 48	10.440 124 70	61/62	7.94	RGI
	C/T	0.001 827 66	10.159 006 40	61/62	7.75	RGR
SNP380	G/T	5.53E-05	17.477 728 30	53/70	12.62	RSVI
	G/T	5.66E-05	17.427 342 40	53/70	12.59	RRL
	G/T	0.000 206 57	14.647 827 40	53/70	10.80	RRSA
	G/T	0.000 320 71	13.722 388 50	53/70	10.19	RVI
	G/T	0.000 504 23	12.780 543 20	53/70	9.55	RRV
	G/T	0.000 879 90	11.636 127 40	53/70	8.77	RGR
	G/T	0.001 791 51	10.198 970 60	53/70	7.77	RGL
	G/T	0.002 224 39	9.767 180 71	53/70	7.47	RGI
SNP508	A/G	0.007 537 15	7.386 370 85	19/104	5.75	RGR
	A/G	0.010 039 52	6.841 612 66	19/104	5.35	RRL
SNP528	C/T	8.97E-05	16.429 440 20	65/58	11.95	RSVI
	C/T	0.000 463 18	12.956 520 40	65/58	9.67	RRL
	C/T	0.001 280 92	10.873 595 40	65/58	8.25	RGR
	C/T	0.001 508 96	10.543 328 50	65/58	8.02	RRSA
	C/T	0.002 070 87	9.909 558 29	65/58	7.57	RVI

续表6　Continued 6

标 记 Marker	等位基因 Allele	*P*值 *P*-value	*F*值 *F* value	自交系数 No. of inbred lines	R^2(%)	性 状 Trait
SNP528	C/T	0.002 438 25	9.584 854 62	65/58	7.34	RGL
	C/T	0.005 585 91	7.961 881 97	65/58	6.17	RRV
	C/T	0.008 757 87	7.100 388 15	65/58	5.54	RGI
SNP576	T/C	1.53E-06	25.573 084 90	36/87	17.45	RRL
	T/C	0.000 576 65	12.503 225 80	36/87	9.37	RGR
	T/C	0.000 839 16	11.732 939 30	36/87	8.84	RSVI
	T/C	0.001 719 60	10.281 016 30	36/87	7.83	RRSA
	T/C	0.006 194 87	7.762 416 23	36/87	6.03	RGL
SNP576	T/C	0.006 629 60	7.632 071 41	36/87	5.93	RRV
	T/C	0.006 816 47	7.578 738 68	36/87	5.89	RVI
	T/C	0.012 668 64	6.404 149 67	36/87	5.03	RGI
SNP585	C/G	0.007 537 15	7.386 370 85	19/104	5.75	RGR
	C/G	0.010 039 52	6.841 612 66	19/104	5.35	RRL
SNP587	G/A	0.007 537 15	7.386 370 85	19/104	5.75	RGR
	G/A	0.010 039 52	6.841 612 66	19/104	5.35	RRL
SNP678	A/G	0.004 157 03	8.535 328 30	37/86	6.59	RSVI
	A/G	0.005 206 36	8.097 938 86	37/86	6.27	RGL
	A/G	0.005 416 10	8.021 535 34	37/86	6.22	RVI
	A/G	0.007 455 69	7.407 135 67	37/86	5.77	RRSA
	A/G	0.033 423 34	4.628 984 03	37/86	3.68	RGI

2.3.2　*ZmICE6*基因dCAPS标记开发

选择非同义突变位点且表型贡献率最大的SNP380(G/T),通过dCAPs Finder在线平台筛选最优酶切位点并确定限制性内切酶为*NheI*,开发标记DNCAP380。PCR扩增耐低温和低温敏感基因型序列全长,具有耐低温基因型的材料,不能被*NheI*特异性切开;扩增产物由G突变为T形成酶切位点,能够被*Nhe*I切为221 bp和25 bp两个片段的材料为低温敏感基因型(图4)。



注:a图中M为*Trans* 2k;1~6孔分别为齐319、掖478、888-9、郑30、莫群17、8415的PCR产物;b图中M为*Trans* 2k;1~6孔分别为齐319、掖478、888-9、郑30、莫群17、8415的酶切产物

Note: a, M, *Trans* 2k, 1-6 wells are PCR products of Qi319, Ye478, 888-9, Zheng30, MoQun17 and 8415 respectively; b, M, *Trans* 2k, 1-6 wells are digestion products of Qi319, Ye478, 888-9, Zheng30, MoQun17 and 8415, respectively

图4　dCAPS标记DNCAP380的开发

Fig.4　Development of dCAPS arker DNCAP380

2.3.3 dCAPS功能标记的验证

以123份玉米自交系为材料(表7),对DNCAP380标记进行验证(图5),耐低温基因型和低温敏感基因型材料的PCR产物经酶切验证后,分别得到246 bp和221 bp的条带。123份自交系中91份自交系具有中耐低温以上的表型,其中8415、7884和77等70份自交系酶切产物大小为246 bp,表现为耐低温基因型,基因型与表型符合率为76.92%;32份自交系具有低温敏感的表型,其中PI42、丹1324、吉A-034等27份自交系酶切产物大小为221 bp和25 bp,表现为低温敏感基因型,基因型与表型符合率为84.38%。

表7 123份玉米自交系耐低温评价

Table 7 Low temperature tolerance evaluation of 123 maize inbred lines

排序 Sort	自交系 Inbred line	评价 Evaluation	评价等级 Rating	类群 Group	血缘 Consanguinity
1	888-9	高耐	Ⅰ	LRC	美国DK888
2	7884	高耐	Ⅰ	LRC	78-6×H84
3	CN165	高耐	Ⅰ	LRC	选自美国3268杂交种
4	绥系707	耐	Ⅱ	LRC	绥系601×丹340
5	莫群17	耐	Ⅱ	Lan	选自Mo17群体
6	吉8415	耐	Ⅱ	-	340改良
7	早8-3	耐	Ⅱ	SPT	-
8	丹9046	耐	Ⅱ	PB	沈5003×铁7922
9	四-387	耐	Ⅱ	Reid	(Mo17×8112)×Mo17
10	L237	耐	Ⅱ	PB	Mo17×沈137
11	PI36	中耐	Ⅲ	LRC	-
12	B104	中耐	Ⅲ	Reid	BS13(S) C5
13	中黄64	中耐	Ⅲ	LRC	PN选自美国64杂交种-1
14	四-434	中耐	Ⅲ	PA	466×桦94
15	郑28-2	中耐	Ⅲ	Reid	Ye478×Tuxpenol
16	辽5114	中耐	Ⅲ	Reid	铁7922×沈5003
17	获唐黄17	中耐	Ⅲ	Lan	获唐白42×海1917×Mo17
18	吉842	中耐	Ⅲ	Lan	吉63×Mo17
19	812	中耐	Ⅲ	PA	8112导入引来种质后代选育
20	416	中耐	Ⅲ	Lan	404×Mo17
21	N528-1	中耐	Ⅲ	LRC	分离自日本种群
22	3189	中耐	Ⅲ	PA	U8112×沈5003(478姊妹系)
23	DH34	中耐	Ⅲ	LRC	丹340变异株
24	CN4379	中耐	Ⅲ	PB	P6CO选系
25	65-1	中耐	Ⅲ	LRC	分离自B-41红骨
26	CWF	中耐	Ⅲ	-	-
27	吉002	中耐	Ⅲ	Lan	Ji63×Mo17
28	PI10	中耐	Ⅲ	Reid	-
29	M502	中耐	Ⅲ	Iodent	黄早四×丹340
30	丹340	中耐	Ⅲ	LRC	白骨旅9×有稃玉米(Co60辐射处理)
31	丹黄02	中耐	Ⅲ	LRC	旅28等10个旅大红骨系统综合种
32	CA90	中耐	Ⅲ	-	-
33	K10	中耐	Ⅲ	Lan	沈5003×长3
34	新自153-2	中耐	Ⅲ	LRC	南斯拉夫种质
35	PH4CV	中耐	Ⅲ	PB	PH7V0/PHB8E2
36	中451	中耐	Ⅲ	LRC	PN—R4513选自美国R4513杂交种杂株
37	旱23	中耐	Ⅲ	-	78599
38	金黄76	中耐	Ⅲ	SPT	外引种选系,粗行
39	丹360	中耐	Ⅲ	LRC	(白轴旅9×有稃玉米)F_2辐照
40	吉419	中耐	Ⅲ	Lan	四419B68HT×Mo17
41	四-287	中耐	Ⅲ	SPT	444×255
42	77	中耐	Ⅲ	-	(黄小l62×l685)×(l87-2×南55)
43	5公	中耐	Ⅲ	LRC	515×公杂
44	CML206	中耐	Ⅲ	LRC	EV7922

续表7　Continued 7

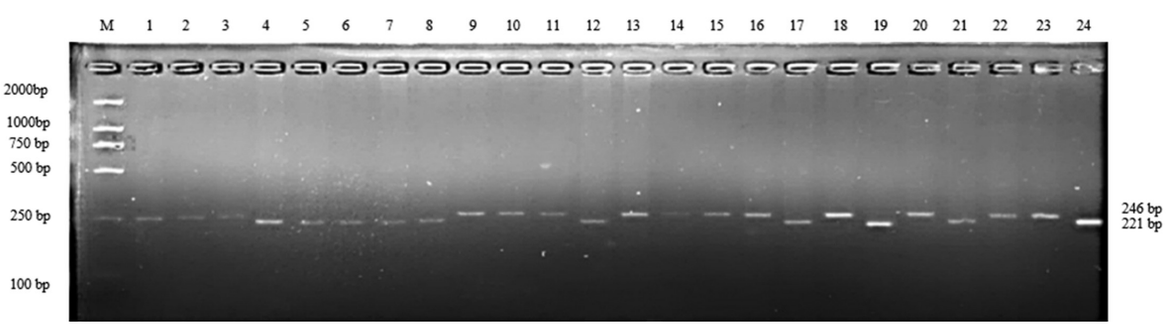
排 序 Sort	自交系 Inbred line	评 价 Evaluation	评价等级 Rating	类 群 Group	血 缘 Consanguinity
45	79-2	中耐	Ⅲ	LRC	京玉1×6625
46	郑28-1	中耐	Ⅲ	Reid	Ye478×Tuxpenol
47	374	中耐	Ⅲ	Lan	(黄早四×群105)×多黄15(先锋综合种)
48	吉001	中耐	Ⅲ	Lan	吉846×Mo17×吉846
49	CA335	中耐	Ⅲ	LRC	PooL33选系
50	PH6WC	中耐	Ⅲ	BSSS	PH01N/PH09B
51	铁9010	中耐	Ⅲ	PA	抗1×丹340
52	鲁2548	中耐	Ⅲ	Reid	齐205×掖478
53	196	中耐	Ⅲ	SPT	黄早四×340
54	C649	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17×金皇后
55	吉81162	中耐	Ⅲ	LRC	从四平市种子公司引进 525×掖107
56	89-1	中耐	Ⅲ	PB	选自78599杂交种
57	PI143	中耐	Ⅲ	SPT	矮原311×LU9801×昌7
58	独321	中耐	Ⅲ	Reid	(独青×异32)
59	唐四平头	中耐	Ⅲ	SPT	唐四平头
60	吉1037	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17×Suwan1/Mo17
61	丹988	中耐	Ⅲ	PB	PN78599
62	J9206	中耐	Ⅲ	LRC	444×丹黄02
63	新自218	中耐	Ⅲ	–	–
64	5311	中耐	Ⅲ	–	5311
65	杂C546	中耐	Ⅲ	LRC	C103杂株
66	吉495	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17×L105/Mo17
67	95-2	中耐	Ⅲ	LRC	B84/C107-7
68	辽6082	中耐	Ⅲ	Reid	5003.7922.8112.郑32.N46.B73微群体
69	丹黄25	中耐	Ⅲ	PB	78599选系
70	中黄68	中耐	Ⅲ	BSSS	美国78599杂交种
71	丹599	中耐	Ⅲ	PB	原78599-20,美国杂交种78599
72	黄C	中耐	Ⅲ	PA	(黄小162/o2×自330/o2)×Tuxpeno-1
73	四-419	中耐	Ⅲ	Lan	$B68^{ht}$×Mo17
74	冀35	中耐	Ⅲ	SPT	黄早四×农家种冀多142
75	D185	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17×B37×Mo17
76	D387	中耐	Ⅲ	Reid	Mo17×L105/8112
77	绥系605	中耐	Ⅲ	Lan	8941×444二环系选育
78	吉412	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17自然杂
79	LX9801	中耐	Ⅲ	SPT	掖502×H21
80	吉046	中耐	Ⅲ	Reid	Mo17自然杂
81	H3	中耐	Ⅲ	PB	–
82	吉465	中耐	Ⅲ	Lan	选自Mo17
83	郑58	中耐	Ⅲ	Reid	掖478改良系
84	吉818	中耐	Ⅲ	LRC	(VT157×吉63)×吉63BC4
85	金黄55	中耐	Ⅲ	PB	78599
86	Y7	中耐	Ⅲ	–	–
87	关17	中耐	Ⅲ	Lan	Mo17×关73(自330×Mo17)
88	485	中耐	Ⅲ	LRC	Ai331×C103
89	东46	中耐	Ⅲ	LRC	大黄46、塔22C等(复合杂交种)
90	特70	中耐	Ⅲ	LRC	合344×422
91	辽2345	中耐	Ⅲ	Reid	铁7922×沈5003
92	材11-8	敏感	Ⅳ	–	330×门可B
93	沈137	敏感	Ⅳ	PB	先锋(海外)6J1K111杂交种
94	汶黄	敏感	Ⅳ	SPT	黄早四×汶青1331抗
95	川273	敏感	Ⅳ	PB	选自78573杂交种
96	郑30	敏感	Ⅳ	PB	郑20×掖478
97	双105	敏感	Ⅳ	SPT	改良自黄早四

续表7 Continued 7

排 序 Sort	自交系 Inbred line	评 价 Evaluation	评价等级 Rating	类 群 Group	血 缘 Consanguinity
98	自330	敏感	Ⅳ	PB	Oh43×可利67
99	塔5	敏感	Ⅳ	LRC	地方品种
100	红玉米	敏感	Ⅳ	X	红玉米
101	H10	高敏	Ⅴ	LRC	H10
102	旱21	高敏	Ⅴ	LRC	78599
103	SH15	高敏	Ⅴ	PB	78599
104	甸11	高敏	Ⅴ	LRC	掖桦甸红骨子
105	黄野四3	高敏	Ⅴ	SPT	黄早四×野鸡红
106	京7	高敏	Ⅴ	SPT	黄早四改良系
107	7537-1	高敏	Ⅴ	Reid	6678/F5-2
108	Mo113	高敏	Ⅴ	Lan	海玉6父本
109	中黄204	高敏	Ⅴ	Lan	Mo17二环系
110	B84	高敏	Ⅴ	Reid	BSSS
111	吉477	高敏	Ⅴ	Reid	源自杂交种HC777
112	CN962	高敏	Ⅴ	SPT	黄早四改良系
113	PI42	高敏	Ⅴ	SPT	黄早四×LU9801×昌7
114	丹1324	高敏	Ⅴ	Lan	Mo17×NN14BHt/Mo17BC3
115	吉A-034	高敏	Ⅴ	PB	Mo17×78599
116	自495	高敏	Ⅴ	LRC	-
117	沈501	高敏	Ⅴ	PB	铁7922×抗1
118	沈136	高敏	Ⅴ	PB	78599
119	郑29	高敏	Ⅴ	Reid	沈5003
120	吉803	高敏	Ⅴ	LCR	吉63×英55BC
121	金黄59	高敏	Ⅴ	PB	78599
122	515	高敏	Ⅴ	SPT	(华风100×矮C103)S2×黄早四
123	5213	高敏	Ⅴ	Lan	Mo17改良系

注：LRC为旅大红骨(Lvda Red Cob Group)；SPT为唐四平头(Tang Sipingtou Group)；Lan为兰卡斯特类群(Lancaster Group)；PA类群(PA group)；PB为瑞德黄马齿种的两个亚群(two subgroups of Reid Yellow Dent)；BSSS为衣阿华坚秆综合种(Iowa Stiff Stalk Synthetic)；Iodent为先锋高产品系(Pioneer Hi-Bred)；X为华北种质类群(North China Germplasm Group)；Reid为瑞德群体(Reid Yellow Dent)

Note: LRC is Lvda Red Cob Group, SPT is Tang Sipingtou Group, Lan is Lancaster Group, PA Group, PB is Two Subgroups of Reid Yellow Dent, BSSS is Iowa Stiff Stalk Synthetic, Iodent is Pioneer Hi-Bred Line, X is North China Germplasm Group, Reid is Reid Yellow Dent Group



注：M为*Trans* 2k，1-24孔为888-9、8415、莫群17、B84、B104、H10、京7、PI42、PI36、L237、77、434、郑30、502、K10、旱23、SH15、CA112、塔5、PI10、甸11、中451、吉419、双105的酶切产物

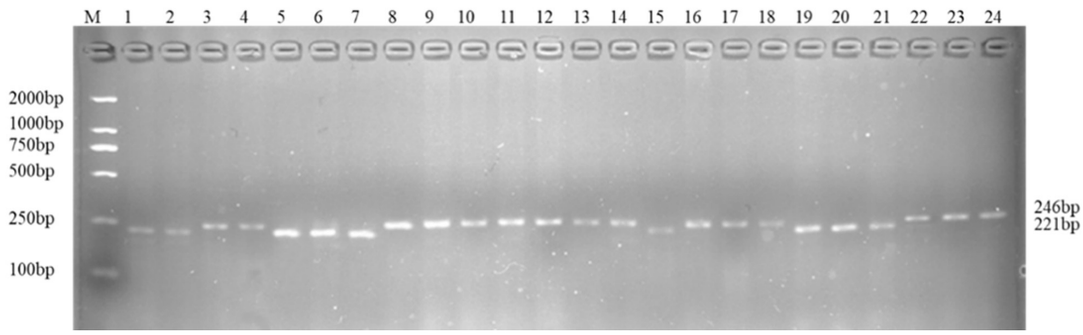
Note: M, *Trans* 2k, 1-24, 888-9, 8415, Moqun17, B84, B104, H10, Jing7, PI42, PI36, L237, 77, 434, Zheng30, 502, K10, Han23, SH15, CA112, Ta5, PI10, Dian11, Zhong451, Ji419, Shuang105 digestion products

图5 部分玉米自交系dCAPS功能标记验证

Fig.5 Validation of dCAPS function markers in some maize inbred lines

酶切验证发现，DNCAP380标记可以有效识别掖478和齐319两个亲本材料，因此，以掖478和齐319为亲本构建的RIL群体中102份家系为材料，进行分子标记验证，其中掖478为耐低温自交系，齐319

为低温高敏感自交系,分别得到246 bp和221 bp/25 bp的产物大小如图6所示,102份RIL群体中70份材料具有中耐低温以上的表型,其中家系ZYQ010、ZYQ054和ZYQ113等57份材料酶切产物大小为246 bp,表现为耐低温基因型,基因型与表型符合率为81.43%。家系ZYQ042、ZYQ155和ZYQ215等13份自交系酶切产物大小分别为221 bp和25 bp,表现低温敏感基因型(表8)。



注:M为Trans 2k;1~24分别表示材料编号ZYQ014、ZYQ032、ZYQ010、ZYQ054、ZYQ091、ZYQ151、ZYQ163、ZYQ079、ZYQ120、ZYQ172、ZYQ225、ZYQ242、ZYQ271、ZYQ012、ZYQ042、ZYQ025、ZYQ052、ZYQ059、ZYQ155、ZYQ215、ZYQ310、ZYQ113、ZYQ099和ZYQ114

Note: M, Trans 2k; 1–24, ZYQ014, ZYQ032, ZYQ054, etc. are family numbers

图6　102份家系部分RIL群体标记验证结果

Fig.6　Partial marker validation results of 102 inbred lines from the RIL population

表8　玉米RIL群体的102份家系耐低温等级和酶切验证结果

Table 8　Validation results of enzyme digestion and cold tolerance grading of 102 inbred lines from a maize RIL population

排序 Sort	家系 Lines	评价等级 Rating	条带大小 Band size	排序 Sort	家系 Lines	评价等级 Rating	条带大小 Band size
1	ZYQ010	Ⅰ	246 bp	27	ZYQ219	Ⅱ	246 bp
2	ZYQ054	Ⅰ	246 bp	28	ZYQ265	Ⅱ	246 bp
3	ZYQ079	Ⅰ	246 bp	29	ZYQ188	Ⅱ	246 bp
4	ZYQ120	Ⅰ	246 bp	30	ZYQ229	Ⅱ	246 bp
5	ZYQ172	Ⅰ	246 bp	31	ZYQ259	Ⅱ	221 bp/25 bp
6	ZYQ225	Ⅰ	246 bp	32	ZYQ358	Ⅱ	221 bp/25 bp
7	ZYQ242	Ⅰ	246 bp	33	ZYQ001	Ⅲ	246 bp
8	ZYQ271	Ⅰ	246 bp	34	ZYQ008	Ⅲ	246 bp
9	ZYQ339	Ⅰ	246 bp	35	ZYQ009	Ⅲ	246 bp
10	ZYQ356	Ⅰ	246 bp	36	ZYQ043	Ⅲ	246 bp
11	ZYQ012	Ⅱ	246 bp	37	ZYQ049	Ⅲ	246 bp
12	ZYQ025	Ⅱ	246 bp	38	ZYQ069	Ⅲ	246 bp
13	ZYQ026	Ⅱ	246 bp	39	ZYQ085	Ⅲ	246 bp
14	ZYQ030	Ⅱ	246 bp	40	ZYQ090	Ⅲ	246 bp
15	ZYQ052	Ⅱ	246 bp	41	ZYQ121	Ⅲ	246 bp
16	ZYQ059	Ⅱ	246 bp	42	ZYQ126	Ⅲ	246 bp
17	ZYQ084	Ⅱ	246 bp	43	ZYQ128	Ⅲ	246 bp
18	ZYQ087	Ⅱ	246 bp	44	ZYQ133	Ⅲ	246 bp
19	ZYQ099	Ⅱ	246 bp	45	ZYQ145	Ⅲ	246 bp
20	ZYQ113	Ⅱ	246 bp	46	ZYQ148	Ⅲ	246 bp
21	ZYQ114	Ⅱ	246 bp	47	ZYQ177	Ⅲ	246 bp
22	ZYQ127	Ⅱ	246 bp	48	ZYQ179	Ⅲ	246 bp
23	ZYQ129	Ⅱ	246 bp	49	ZYQ190	Ⅲ	246 bp
24	ZYQ130	Ⅱ	246 bp	50	ZYQ206	Ⅲ	246 bp
25	ZYQ189	Ⅱ	246 bp	51	ZYQ207	Ⅲ	246 bp
26	ZYQ208	Ⅱ	246 bp	52	ZYQ224	Ⅲ	246 bp

续表8 Continued 8

排 序 Sort	家 系 Lines	评价等级 Rating	条带大小 Band size	排 序 Sort	家 系 Lines	评价等级 Rating	条带大小 Band size
53	ZYQ277	Ⅲ	246 bp	78	ZYQ264	Ⅳ	246 bp
54	ZYQ285	Ⅲ	246 bp	79	ZYQ272	Ⅳ	246 bp
55	ZYQ293	Ⅲ	246 bp	80	ZYQ281	Ⅳ	246 bp
56	ZYQ307	Ⅲ	246 bp	81	ZYQ284	Ⅳ	246 bp
57	ZYQ312	Ⅲ	246 bp	82	ZYQ298	Ⅳ	246 bp
58	ZYQ314	Ⅲ	246 bp	83	ZYQ305	Ⅳ	246 bp
59	ZYQ321	Ⅲ	246 bp	84	ZYQ330	Ⅳ	246 bp
60	ZYQ342	Ⅲ	246 bp	85	ZYQ332	Ⅳ	246 bp
61	ZYQ013	Ⅲ	221 bp/25 bp	86	ZYQ352	Ⅳ	246 bp
62	ZYQ042	Ⅲ	221 bp/25 bp	87	ZYQ061	Ⅳ	221 bp/25 bp
63	ZYQ155	Ⅲ	221 bp/25 bp	88	ZYQ176	Ⅳ	221 bp/25 bp
64	ZYQ184	Ⅲ	221 bp/25 bp	89	ZYQ187	Ⅳ	246 bp
65	ZYQ191	Ⅲ	221 bp/25 bp	90	ZYQ028	Ⅴ	221 bp/25 bp
66	ZYQ215	Ⅲ	221 bp/25 bp	91	ZYQ065	Ⅴ	221 bp/25 bp
67	ZYQ218	Ⅲ	221 bp/25 bp	92	ZYQ159	Ⅴ	221 bp/25 bp
68	ZYQ254	Ⅲ	221 bp/25 bp	93	ZYQ183	Ⅴ	246 bp
69	ZYQ255	Ⅲ	221 bp/25 bp	94	ZYQ233	Ⅴ	221 bp/25 bp
70	ZYQ310	Ⅲ	221 bp/25 bp	95	ZYQ283	Ⅴ	246 bp
71	ZYQ078	Ⅳ	221 bp/25 bp	96	ZYQ366	Ⅴ	246 bp
72	ZYQ097	Ⅳ	246 bp	97	ZYQ014	Ⅴ	221 bp/25 bp
73	ZYQ134	Ⅳ	246 bp	98	ZYQ032	Ⅴ	221 bp/25 bp
74	ZYQ169	Ⅳ	246 bp	99	ZYQ091	Ⅴ	221 bp/25 bp
75	ZYQ193	Ⅳ	246 bp	100	ZYQ151	Ⅴ	221 bp/25 bp
76	ZYQ205	Ⅳ	246 bp	101	ZYQ163	Ⅴ	221 bp/25 bp
77	ZYQ227	Ⅳ	246 bp	102	ZYQ365	Ⅴ	221 bp/25 bp

3 结论与讨论

bHLH基因家族是真核生物中第二大转录因子家族，在植物中广泛存在，参与植物多种生物学过程，在作物应对非生物胁迫方面也有重要作用[10]。野生山葡萄(*Vitis amurensis*Rupr.)的*VabHLH1*基因转拟南芥后，提高了拟南芥的耐低温性[11]。水稻*OsbHLH1*的表达受低温胁迫的诱导，这表明该基因可能参与了响应低温胁迫的信号通路[12]。有研究表明，苹果*MdbHLH33*与*MdMYB308L*相互作用，与*MdCBF2*和*MdDFR*基因的启动子结合并激活其表达，正向调节苹果的耐低温性和花青素积累[13]。

本课题组前期通过QTL的方法挖掘到萌发期耐低温基因*ZmICE6*，该基因包含bHLH结构域，*ZmICE6*基因启动子可以驱动GUS蛋白在拟南芥叶片部表达。启动子侧翼序列中包括与低温胁迫相关的顺式作用元件、调控脱落酸反应的元件以及参与生长素调控的元件等与非生物胁迫相关的调控元件，表明*ZmICE6*基因在响应低温等非生物胁迫中具有潜在的重要调控作用，可能通过这些元件与外界环境信号相互作用，进而调控玉米对低温的响应过程。Lee Y等[14]基于水稻*HAN1*、*COLD11*和*COLD1*等基因在水稻耐低温性调控中发挥关键作用，选用372份水稻品种，利用KASP、indel和SNP标记检测基因变异，结合表型分析，评估了水稻种质的耐低温性，为耐低温水稻的选育提供了重要依据。SNP分子标记技术同样可以用于建立种质资源库，通过对195份经过田间抗寒评价的橡胶树种质进行SNP标记分析，分析橡胶树抗寒种质的遗传多样性，构建核心种质库，为橡胶树抗寒育种和种质资源管理提供了理论依据[15]。基于SNP开发dCAPS分子标记技术，在基因功能研究和分子辅助育种方面具有重要作用。在对小麦*TaERF73*基因进行研究时，针对4个SNP进行dCAPS分子标记开发，并进行关联分析，携带Hap-4B-2单倍型的材料相比Hap-4B-1单倍型，株高和穗颈节长度更短，千粒重更高，分蘖期

扎根更深，表明dCAPS标记开发对改良小麦根系结构、株高和产量具有重要价值[16]。

本研究对*ZmICE6*基因CDS区进行序列变异分析，在扩增出的123份耐低温等级不同的玉米自交系中，检测到12个SNP和两个Indel，其中包含4个非同义突变SNP。单倍型HAP3为优异单倍型，包含36份中耐及以上级别耐低温材料。结合本实验室前期萌发期耐低温性鉴定结果，进行关联分析发现，非同义突变SNP380与萌发期相对根长等5个性状极显著相关，该位点对玉米耐低温性状影响显著。对DNCAP380标记进行验证发现，具有耐低温表型的自交系中表型与基因型符合率为76.92%，低温敏感表型的自交系中符合率为84.38%。在以玉米耐低温自交系掖478和低温高敏感自交系齐319为亲本构建的RIL群体中选择102份材料，对该标记进行验证，符合率为81.43%。结果表明，*ZmICE6*基因与玉米耐低温性显著关联，为利用分子标记辅助选育耐低温玉米品种提供理论依据。

参考文献：

[1] 徐婷，樊景胜，连永利，等 . 低温对高纬度半干旱区玉米主栽品种种子萌发特性的影响[J] . 安徽农业科学，2021，49(9)：25-27 .
XU T, FAN J S, LIAN Y L, et al. Effects of low temperature on seed germination characteristics of main cultivated maize varieties in high-latitude semi-arid regions[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(9): 25-27. (in Chinese)

[2] LIU C, SCHLÄPPI M R, MAO B, et al. The *bZIP73* transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(9): 1834-1849.

[3] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Genes & Development, 2003, 17(8): 1043-1054.

[4] RITONGA F, NGATIA J, WANG Y R, et al. AP2/ERF, an important cold stress-related transcription factor family in plants: A review[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2021, 27(9): 1953-1968.

[5] JU Y L, YUE X F, MIN Z, et al. *VvNAC17*, a novel stress-responsive grapevine(*Vitis vinifera* L.) NAC transcription factor, increases sensitivity to abscisic acid and enhances salinity, freezing, and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 146: 98-111.

[6] DAI X Y, WANG Y Y, ZHANG W H. *OsWRKY74*, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(3): 947-960.

[7] JIANG H T, SHI Y T, LIU J Y, et al. Natural polymorphism of *ZmICE1* contributes to amino acid metabolism that impacts cold tolerance in maize[J]. Nature Plants, 2022, 8(10): 1176-1190.

[8] ZHOU Y, LU Q, MA J, et al. Using a high density bin map to analyze quantitative trait locis of germination ability of maize at low temperatures[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 978941.

[9] ZHANG H, ZHANG J, XU Q, et al. Identification of candidate tolerance genes to low-temperature during maize germination by GWAS and RNA-seqapproaches[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 333.

[10] GUO J, SUN B, HE H, et al. Current understanding of *bHLH* transcription factors in plant abiotic stress tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4921.

[11] XU W R, ZHANG N B, JIAO Y T, et al. The grapevine basic helix-loop-helix *(bHLH)* transcription factor positively modulates *CBF*-pathway and confers tolerance to cold-stress in *Arabidopsis*[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(8): 5329-5342.

[12] WANG Y J, ZHANG Z G, HE X J, et al. A rice transcription factor *OsbHLH1* is involved in cold stress response[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(8): 1402-1409.

[13] AN J P, WANG X F, ZHANG X W, et al. An apple MYB transcription factor regulates cold tolerance and anthocyanin accumulation and undergoes MIEL1-mediated degradation[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(2): 337-353.

[14] LEE Y, JANG S G, JIN B, et al. Integrating molecular markers and phenotypic analysis to assess cold tolerance in rice germplasm[J]. Molecular Breeding, 2025, 45(2): 23.

[15] TIAN M J, LI W X, LUO P, et al. Genetic diversity analysis and core germplasm bank construction in cold resistant germplasm of rubber trees(*Hevea brasiliensis*)[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 14533.

[16] DU Y, CHAO N L, XIN G M, et al. *TaERF73* is associated with root depth, thousand-grain weight and plant height in wheat over a range of environmental conditions[J]. Food and Energy Security, 2021, 11: e325.

(责任编辑：李万良)