

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

酒米品種美山錦之苗期高度耐寒性基因的定位

Mapping QTL of High Tolerance to Low Temperature
at Seedling Stage in a Sake-brewing Rice Variety Miyamanishiki

張中行

Chung-Hsing Chang

指導教授：林順福 博士

Advisor : Shun-Fu Lin, Ph. D.

中華民國111年6月

June, 2022



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



酒米品種美山錦之苗期高度耐寒性基因的定位
Mapping QTL of High Tolerance to Low Temperature at
Seedling Stage in a Sake-brewing Rice Variety
Miyamanishiki

本論文係 張中行 君(R09621106)在國立臺灣大學農藝學系、
所完成之碩士學位論文，於民國 111 年 06 月 16 日承下列考試委員
審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

臺南區農業改良場嘉義分場副研究員兼分場長
陳榮坤 博士 (召集委員)

Handwritten signature of Chen Rongkuan in blue ink, positioned above a horizontal line.

國立嘉義大學農藝學系助理教授
曾鈺茜 博士

Handwritten signature of Zeng Yuxian in blue ink, positioned above a horizontal line.

國立臺灣大學農藝學系副教授
林順福 博士 (指導教授)

Handwritten signature of Lin Shunfu in blue ink, positioned above a horizontal line.



謝辭

正如同論文口試結束時陳榮坤分場長所言，這份論文的完成並非僅是我個人的付出，它更是奠基於積累下這些研究材料、研究方法及結果的前人努力之上。所以每當掂著這百來頁文本的重量，我總是滿懷感恩之意。首先感謝林順福老師在研究過程中給予我的空間及信任，讓我在研究建構與執行上都親自完成，是非常寶貴的經驗，更感謝老師在討論過程中總是能給予實用的建議與協助並指出我論述中的盲點，指引我學習的方向也讓這份論文更加周延而縝密。感謝苡廷學姐留下的研究材料及資料，為這篇研究打造了堅實的基礎；感謝師瑋學長、伯駿學長在實驗技術及軟體分析上的指導，讓這篇研究能夠順利確實地執行。感謝遠道而來擔任口試委員的陳榮坤分場長及曾鈺茜老師給予中肯的意見及修改建議，讓這篇論文更加流暢而完整。感謝可靠的新瑜在實驗過程及口試準備上的協助，讓我可以安心完成學位考試。感謝臺大農藝系大學至今六年的栽培，從對農藝一竅不通到現在完成這份論文，謝謝一路上所有老師與同儕的教導與相互砥礪。感謝這份論文所有引用的前人研究，讓這篇研究能夠順利建構執行並在科學證據上論述主題。最後感謝我的父母讓我無後顧之憂地完成這個碩士學位，我將會努力發揮所學貢獻於社會。



中文摘要

低溫寒害長期以來都是造成臺灣水稻產量損失的主要天然災害之一，其中又以第一期稻作秧苗期最常發生，會導致生長緩慢及秧苗矮小，甚至黃化枯萎。為避免寒害造成水稻產量的重大損失，選育耐寒品種才是根本且有效的策略。因此本研究以日本高耐寒酒米品種「美山錦」及臺灣的良質栽培品種「臺南 16 號」兩粳稻品種作為雜交親本，利用其 $F_{2:3}$ 族群進行苗期耐寒性的基因座定位，並探討其遺傳機制。結果顯示，本研究共定位到四個苗期耐寒性相關的 QTL，其耐寒等位基因皆來自美山錦品種，可提高苗期之耐寒性。其中 *qLTT-2* 及 *qLTT-7* 效應較小且耐寒外表型為隱性遺傳模式；*qLTT-5* 及 *qLTT-6* 效應較大且耐寒外表型為加性遺傳模式。由前人選殖之耐寒基因所對應本研究 QTL 所在範圍進行 DNA 定序，結果並未發現兩雜交親本間 DNA 序列之差異，表示本研究所涉及之基因可能在此些選殖基因之外。此外，本研究同時使用與 *qLTT-5* 及 *qLTT-6* 緊密連鎖之分子標誌 RM17764 及 CH0629 篩選耐寒個體，發現其正確率可達 100 %，將可有效利用於苗期耐寒品系之選拔。本研究成功以兩粳稻雜交族群進行高耐寒酒米品種美山錦苗期耐寒性的 QTL 定位及遺傳分析，其結果可作為未來水稻耐寒遺傳研究抑或耐寒品種選育之參考。



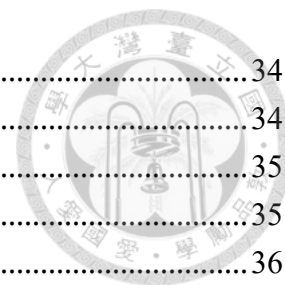
Abstract

Cold surges is one of the main natural disasters causing rice production loss in Taiwan. This low temperature stress usually happens at the seedling stage of the first cropping season, which severely decreases seedling vigor by causing slow growth, leaf yellowing, or even wilting. To avoid the yield loss caused by cold surges, breeding for a cold tolerant rice variety is an efficient way to tackle the problem. In this study, we carried out a quantitative trait loci (QTL) mapping of low temperature tolerance at seedling stage (LTT-S) and analyzed the genetic mechanisms in an $F_{2:3}$ population derived from the cross between Miyamanishiki (Mi), a highly low temperature tolerant Japanese sake-brewing cultivar, and Tainan 16 (TN16), a Taiwanese japonica rice variety. The result shows that there are four QTL associated with LTT-S, and the tolerant alleles are all from Mi. *qLTT-2* and *qLTT-7* are minor QTL and their phenotypes of LTT-S are presumed as the recessive genetic mechanism; *qLTT-5* and *qLTT-6* are the major QTL and their phenotypes of LTT-S are presumed as the additive genetic mechanism. We also carried out DNA sequencing on annotated cold tolerance relating genes within QTL intervals of our study, but we did not detect any difference between DNA sequences of Mi and TN16, indicating that those genes are not related to QTL associated with LTT-S in this study. Furthermore, we used two SSR markers (RM17764 and CH0629) which are closely linked with *qLTT-5* and *qLTT-6* to select low temperature tolerant lines. By using these two markers, we obtained 100 % accuracy, suggesting that these markers can be applied to the selection of LTT-S. The results of QTL mapping and genetic analysis could provide useful information for future genetic studies and breeding programs on LTT-S of rice.

目錄



口試委員會審定書.....	i
謝辭.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract	iv
圖目錄.....	vii
表目錄.....	viii
附表目錄.....	ix
前言.....	1
前人研究.....	4
一、SSR 分子標誌及數量性狀基因座定位.....	4
二、水稻苗期耐寒性外表型評估.....	6
三、水稻苗期耐寒性相關 QTL.....	8
四、水稻苗期耐寒性相關已知基因及遺傳分子調控機制.....	9
(一) 離層酸(ABA)訊號傳導.....	10
(二) 鈣離子訊號傳導.....	10
(三) 活化氧族訊號傳導.....	11
材料與方法.....	15
一、試驗材料.....	15
二、遺傳背景建構.....	15
三、耐寒性外表型調查.....	16
四、QTL mapping	17
五、定序分析.....	17
(一) 植株 DNA 萃取	17
(二) 基因之 DNA 序列引子設計	19
(三) 聚合酶連鎖反應及瓊脂膠電泳分析	19
(四) PCR 產物定序	20
結果.....	21
一、連鎖圖譜之建立.....	21
二、基因型比例分布.....	24
三、外表型調查及比例分布.....	27
(一) 親本外表型調查	27
(二) 外表型比例分布	27
四、苗期耐寒性的 QTL 定位及遺傳分析.....	30
(一) 苗期耐寒性的 QTL 定位	30
(二) 苗期耐寒性的遺傳分析	30



五、	苗期耐寒性相關 QTL 之定序分析.....	34
(一)	苗期耐寒性相關 QTL 的定序位置	34
(二)	<i>qLTT-2</i> 定序分析	35
(三)	<i>qLTT-5</i> 定序分析	35
(四)	<i>qLTT-6</i> 定序分析	36
(五)	<i>qLTT-7</i> 定序分析	36
討論.....		40
一、	連鎖圖譜之建立.....	40
二、	親本的苗期耐寒性.....	41
三、	外表型調查.....	42
四、	外表型的比例分布與遺傳模式.....	46
五、	水稻苗期耐寒性之 QTL 定位	47
(一)	<i>qLTT-2</i>	47
(二)	<i>qLTT-5</i>	49
(三)	<i>qLTT-6</i>	51
(四)	<i>qLTT-7</i>	54
六、	輔助選拔苗期耐寒性基因型之分子標誌推薦.....	64
七、	現況困難與未來展望.....	64
結論.....		67
參考資料.....		68
附錄.....		90



圖目錄

圖一、本研究使用之連鎖圖譜.....	61
圖二、 F_2 族群之分子標誌基因型分布.....	26
圖三、經低溫處理後秧苗外表型.....	28
圖四、TN16 秧苗低溫處理後病徵	28
圖五、三品種經低溫處理後株高及根長比較.....	29
圖六、 $F_{2:3}$ 族群之苗期耐寒性外表型的分佈情形	29
圖七、 $F_{2:3}$ 族群苗期耐寒性的數量性狀基因座定位	32
圖八、四個最靠近 QTL 的分子標誌其基因型與外表型之分佈	33
圖九、本研究 QTL 區間中水稻苗期耐寒相關之已知基因與 SNP 位點片段擴增之引子位置示意图.....	39
圖十、 $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 區間內水稻耐寒相關轉錄體片段擴增之引子位置示意图	63



表目錄

表一、水稻苗期耐寒性相關 QTL 研究結果列表.....	9
表二、水稻苗期耐寒性相關基因列表(修改自 Najeeb et al. (2021))	12
表三、水稻苗期耐寒性目測檢定評估表.....	16
表四、DNA 萃取緩衝液之配方表	18
表五、核酸溶解緩衝液之配方表.....	18
表六、 F_2 族群連鎖圖譜各染色體分子標誌數目及連鎖群長度.....	22
表七、各分子標誌中例外基因型之個數.....	25
表八、 $F_{2:3}$ 族群苗期耐寒性的數量性狀基因座及其外表型貢獻量	32
表九、苗期耐寒性相關 QTL 之加性效應與顯性效應.....	33
表十、苗期耐寒性所定位的 QTL 位置、估計區間及位置有重疊的前人研究.....	37
表十一、本研究 QTL 區間中水稻苗期耐寒相關之已知基因與 SNP 位點片段擴增之引子列表	38
表十二、各批材料低溫處理後恢復期天數及天氣情形.....	45
表十三、與 $qLTT-2$ 、 $qLTT-5$ 、 $qLTT-6$ 及 $qLTT-7$ 位置重疊之前人研究	56
表十四、 $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 區間內水稻耐寒相關轉錄體片段擴增之引子列表	58



附表目錄

附表一、 $qLTT-2$ 、 $qLTT-5$ 、 $qLTT-6$ 及 $qLTT-7$ 區間內植物耐寒反應相關轉錄體列表	90
---	----



前言

稻 (*Oryza sativa* L.)為禾本科稻屬一年生單子葉自交作物，其全球產量於 2019 年達到 7.55 億公噸，僅次於玉米及小麥，是目前世界第三大作物 (FAO, 2021)。稻米為世界一半以上人口之主食，貢獻了全球 21%的熱量來源 (Nalley et al., 2017)。但隨著世界人口數逐年攀升，當今的作物生產狀態將難以滿足未來龐大人口的糧食需求，就稻米而言，其年產量需要逐年增加 1.2-1.5%才足以確保全球糧食安全 (Seck et al., 2012)。另一方面，全球暖化造成的氣候變遷問題逐年惡化，極端氣候發生頻率增加，以非生物逆境形式衝擊著農業生產，不但造成經濟上損失，更可能形成社會問題。於是，如何在維持高產量的情況下兼顧對於非生物逆境耐受性便成為當代水稻研究者的主要課題與挑戰。

稻被廣泛栽培於 100 多個國家，其中 90%國家集中於亞洲，是亞洲地區重要農藝作物 (Fukagawa and Ziska, 2019)。而在位於亞洲的臺灣，水稻更是最主要的栽培作物。2020 年其產量達約 175 萬公噸，產值約 387 億元新臺幣，佔臺灣農產品生產總值 7.69%，居農藝作物之冠 (行政院農業委員會農糧署，2021)。稻作栽培以亞洲栽培稻為主，進一步可分為印度型 (*indica*)、日本型 (*japonica*)、熱帶梗型 (*javanica*) 三亞種，其中又以前二亞種為主。印度型稻又被稱為秈稻，主要分布於低緯度地區，具耐高溫、不耐寒、米粒細長及支鏈澱粉少等特色；日本型稻又被稱為粳稻，主要分布於較高緯度地區，具不耐高溫、較耐寒、米粒圓短及支鏈澱粉較多等特色。臺灣位於副熱帶地區，秈、粳稻皆有栽培，其中又以粳稻為大宗 (行政院農業委員會農糧署，2021)。臺灣水稻栽培歷史已久，單位面積生產量在前人努力下已達一定水準，但端詳近年水稻單位面積生產量，年與年之間仍會有所參差 (行政院農業委員會農糧署，2021)，其主要原因來自於病蟲害與氣候條件兩者影響。病蟲害問題尚可透過栽培策略調整及農業資材施用而達到防治目的，但不良氣候條件在田間卻難以人為防範及控制。據農委會統計，在臺灣造成水稻損失的天然災害主要為低溫、



豪雨、乾旱及颱風 (行政院農業委員會農糧署, 2021)。其中低溫寒害會使得水稻在秧苗期黃化枯萎與生長停滯，在生殖生長期也會降低穗數及稔實率，而造成產量損失 (Andaya and Mackill, 2003ab)。雖說臺灣水稻栽培以相對較耐寒的梗稻為主，但隨著氣候變遷，近年來臺灣偶發性低溫發生頻率增加，對於梗稻生產的影響也更加劇烈。例如 2020 年 1 月 29 日及 4 月 13 日臺灣連續遭遇寒流侵襲，造成稻作寒流災損，估計損失高達新臺幣 1 億元以上 (行政院農業委員會農糧署, 2021)。2020 年 12 月及 2021 年 1 月亦有低溫寒害的發生，影響農民生計，仰賴政府提供因應與救助措施。

低溫寒害即植物體由於低溫所導致生理受阻、生長停滯，甚至植株死亡的現象，其又可以危害發生之溫度範圍區分成 0°C 以下的凍害，以及 0°C 以上與最適生長溫度以下的冷害 (丁文彥, 2004)。水稻最適生長溫度為 $25-30^{\circ}\text{C}$ ，在日平均溫度低於 20°C 時即可能影響其正常生長發育，對 15°C 以下低溫則相對更加敏感，會因為遭受低溫時生長期的不同階段而產生不一的負面影響 (Andaya and Mackill, 2003b)。在種子萌芽期會延緩發芽時間及降低發芽率 (Ali et al., 2006; Cruz and Milach, 2004)；在營養生長期則會造成分蘗減少、生長速度緩慢、發育速度不一、葉片黃化、葉片捲曲及葉片萎凋，甚至植株腐敗或死亡 (Lone et al., 2018; Zhang et al., 2014a)；在生殖生長期則會使稻穗及花粉發育異常、花藥發育停止、花藥不正常開裂及稔實率下降。這些低溫寒害對水稻造成的影響，最終會導致稻穀充實率下降，影響稻米品質與產量 (Shakiba et al., 2017; Suh et al., 2010)。

低溫寒害在臺灣水稻兩個期作皆有發生可能，其中以第一期稻作最常發生。第一期稻作於秧苗期經常會遭遇低溫冷氣團，導致秧苗矮小、生長緩慢、甚至黃化枯萎，影響幼苗生長勢；在 4、5 月梅雨季節也常遭遇極端天氣，影響孕穗期植株正常發育，導致稔實率、產量降低。第二期稻作則在孕穗期至乳熟期容易遭逢低溫寒害，影響其生殖生長期發育，降低稻穀充實率，影響米質及產量 (林等人, 2000；李超運, 2000；黃益田, 2017)。且未來若在第一期作實施直播稻栽培，則將面臨種子萌芽期的寒害問題 (Najeeb, 2021)。目前臺灣對於稻作低溫寒害的對策，主要以栽培時



期調整、敷蓋保溫及以灌溉水緩衝田間水溫三者。栽培時期調整即是依據氣象預報安排插秧等農作時間，避開低溫寒害的影響 (鄭等人，2019)；敷蓋保溫則是在育苗期剛出秧時覆蓋一層不織布或塑膠布，保持溫度以避免氣溫驟降 (丁文彥，2004；鄭等人，2019)；灌溉水緩衝則因在插秧後本田苗期無法敷蓋，故利用水比熱大的原理以緩衝氣溫的變化 (黃益田，2007)。上述三種方法雖能有效緩解較短期、較輕微的低溫影響，但在栽培時期可調整的幅度有限，且敷蓋保溫需要額外的資材及人工投入，而灌溉水緩衝則是需要充足的水資源。隨著氣候變遷問題加劇，極端天氣與偶發性低溫的頻率增加，三者的作用都可能越趨有限，因此以育種方法提升現行水稻栽培品種耐寒性或育成耐寒新品種才能穩定稻作生產，而長期避免寒害災損的有效策略。

關於水稻耐寒性的研究，國際上專家學者以遺傳層次、生理層次、外表型評估、數量性狀基因座 (QTL) 定位及基因鑑定等不同面向切入探討，已累積出豐碩成果 (Najeeb, 2021)。國內關於水稻耐寒性的研究，多關注不同品種耐寒性評估及低溫防治策略 (鄭等人，2019)，少數遺傳層次的研究則是以較不耐寒的秈稻為對象(劉等人，2020)，對於廣泛栽培的粳稻，其耐寒性則鮮少有所討論。

本研究室先前研究中建立了臺灣良質粳稻品種臺南 16 號與日本優良酒米品種美山錦雜交產生之 $F_{2:3}$ 族群 (連苡廷，2019)，兩親本皆為帶有日本品種遺傳背景的粳稻品種，相較於秈稻品種有較高的耐寒性，而其中美山錦原栽培於日本長野縣等高海拔地區具有優良之耐寒性，較臺南 16 號更為耐寒。本研究以此族群為材料進行苗期耐寒性外表型評估，並利用其 F_2 世代所建立之 SSR 分子標誌基因型資料，構築連鎖圖譜定位耐寒性相關的 QTL，並且進一步瞭解其遺傳機制，以期作為未來臺灣粳稻耐寒性育種的參考。



前人研究

一、SSR 分子標誌及數量性狀基因座定位

在 1900 年代孟德爾遺傳理論受到廣泛接納後，隨著遺傳學與分子生物技術的進展，奠基於基因體 DNA 序列變異的分子標誌技術逐漸發展成熟，成為連結外表型與基因型的有效工具，對作物改良有著深遠的影響 (Lateef, 2015)。與控制性狀之基因緊密連鎖，或位於基因上的分子標誌遂成為作物育種選拔的依據。在技術演進下，分子標誌發展出不同的類型，主要可以分為基於限制酶及 DNA 雜合技術的分子標誌 (如: RFLP)、基於 PCR (聚合酶連鎖反應) 的分子標誌 (如: AFLP、RAPD、SSR)，以及基於 DNA 序列分析的分子標誌 (如: SNP) 共三類型(Garrido-Cardenas et al., 2018)。

本研究所使用的 SSRs (Simple Sequence Repeats) 係基於 PCR 的分子標誌技術，其原理在於生物基因體中大量存在著以 1-8 bp DNA 序列為單位的簡單重複序列，重複序列片段的重複次數在物種內會因演化而有所不同 (Hamada and Kakunaga, 1982)。因此根據該重複序列兩端的保守序列位置設計 PCR 引子，擴增該重複序列片段，便可以瓊脂膠電泳區分不同品系的該重複序列片段長度，即測得品系間遺傳上的差異以利後續分析。SSRs 廣泛分佈在原核生物及真核生物，甚至出現於葉綠體和粒線體基因體中 (Chung and Staub, 2003; Nishikawa et al., 2005)，其具有穩定性高、多型性高的優點，且呈共顯性遺傳，相對於顯性分子標誌能夠提供更多遺傳資訊，因此廣泛應用在遺傳研究 (Miah et al., 2013)。水稻作為第一個基因體完整定序的穀類作物 (International Rice Genome Sequencing, 2005)，平均每 8 kb 就有一個以 2-4 bp DNA 序列為單位至少 8 重複的簡單重複序列，因此有利於 SSR 分子標誌的大量開發 (Goff et al., 2002)。於 2007 年已有研究團隊在秈稻與粳稻間開發出 52485 個具有多型性的 SSR 分子標誌 (Zhang et al., 2007)，在次世代定序技術發展下，更是大幅降低了 SSR

分子標誌的開發的時間與費用 (Abdelkrim et al., 2009; Churbanov et al., 2012)。因此水稻基因體的 SSR 分子標誌系統已臻完善，被廣泛應用在抗病、產量改良及數量性狀基因座定位 (QTL mapping)等水稻遺傳研究及育種應用上 (Daware et al., 2016; Fjellstrom et al., 2004; Tabkhkar et al., 2018; Zhang et al., 2009)。

QTL mapping 則是在分子標誌技術成熟後所發展出的應用方向。數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL)指的是基因體中控制特定數量型性狀的基因位置 (Abiola et al., 2003)。數量型性狀的外表型值呈現連續性分布，通常由多基因所控制且易受環境影響，因此發展出了 QTL mapping 研究方法，由分子標誌所得之基因型資料及外表型資料間之關聯性來探索可能的 QTL 位置，以利基因探勘及育種選拔。QTL mapping 主要流程如下: (1)針對材料進行外表型性狀及分子標誌基因型調查。(2)由基因型資料建構連鎖圖譜並參考物理圖譜進行核對。(3)結合基因型及外表型資料，以演算法比較各位點不同基因型個體間之外表型值差異，找出潛在的 QTL 位置 (Broman and Sen, 2009; Broman et al., 2003)。

QTL mapping 方法在遺傳研究及育種選拔之應用均已經十分廣泛，就水稻而言，1994 年便有抗稻熱病 QTL 分析的研究發表 (Wang et al., 1994)，至今仍應用在抗生物逆境、抗非生物逆境、品質及產量等研究中 (Andargie et al., 2018; Kebriyaaee et al., 2012; Rabiei et al., 2015; Zhang et al., 2009)。而本研究使用 F_2 世代基因型資料及 $F_{2:3}$ 世代外表型資料進行 QTL mapping 及遺傳分析，兩筆資料雖然來自不同世代，不過此方法已在水稻缺氧下發芽率、乾旱下產量及耐鋁等性狀之 QTL mapping 研究中且被證實能有效使用 (Baltazar et al., 2019; Jahan et al., 2021; Solis et al., 2017)。



二、水稻苗期耐寒性外表型評估

水稻苗期耐寒性在亞熱帶、溫帶及高海拔水稻栽培地區是重要農藝性狀。水稻於苗期遭遇低溫逆境會造成生長緩慢、葉片黃化、葉片乾燥及幼苗生長勢降低，嚴重時甚至會導致植株死亡 (Lone et al., 2018; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2014a)。基於這些水稻低溫逆境的生理反應，不同水稻苗期耐寒性之 QTL 研究中會由於地理位置、品種材料及資源成本等等的考量，而採取不同的苗期耐寒性外表型評估方法，以下就環境、處理條件及評估指標三方面分述：

就低溫處理環境而言，多數研究採用室內控溫生長箱或水浴的方式，也有少數研究採取較高海拔種植或冷水灌溉的田間低溫處理，例如：Han et al. (2004) 於韓國農部以 17°C 冷水灌溉田區；鄭等人 (2019) 將耐寒性檢定圃設置在海拔 500 公尺的田區。

就材料處理時期、處理溫度及處理時間而言，從 2 - 3.5 葉齡、4°C - 17°C 及 2 天 - 18 天的低溫處理條件都有研究團隊採用，以下舉例分述：Bertin et al. (1996) 以秈、梗稻共 16 品種各 20 株，於 2 葉齡以 10°C 低溫分別處理 3、6 及 9 天，並在溫室恢復 10 天後評估；Andaya et al. (2003b) 以 M202 × IR50 雜交族群的 191 個 RILs 於 3 葉齡以 9°C 低溫處理，於處理後第 8、14、16 與第 18 天評估；Kim et al. (2011) 以 50 個水稻種原各 6 - 8 株，於 3 葉齡以 9°C 低溫處理 8 至 18 天，恢復 14 天後評估；Koseki et al. (2010) 對非洲稻 (W1943)、秈稻 (GLA4) 雜交族群 $F_{2:3}$ 於 3.5 葉齡以 4°C 低溫處理 6 天，並在溫室恢復 14 天後評估；Zhang et al. (2011) 以 *OVP1* 轉殖材料播種後 15 天的幼苗 150 株，用 4°C 低溫處理 6 天後評估；Bonnecarrere et al. (2011) 以梗稻品種 (L2825CA INIA Tacuarí) 及秈稻品種 (IR50) 於 3 葉齡使用 10°C 低溫處理 2 天後評估；Suh et al. (2011) 以熱帶梗稻 (IR66160-121-4-4-2) 與溫帶梗稻 (Geumobyeeo) 雜交產生之 153 個 RILs 於 3 葉齡使用 10°C 低溫處理 7 天後評估；Wang et al. (2016) 以



295 水稻種原於 3 葉齡時使用 8°C 低溫處理 3 天後評估；鄭等人 (2019) 則以臺灣水稻品種於 2.5 至 3 葉齡時移至耐寒檢定圃處理 7 天後評估。

而低溫處理後的水稻苗期耐寒性外表型評估指標，主要包括鮮重 (Bonnecarrere et al., 2011)、低溫處理後存活率 (Bertin et al., 1996; Koseki et al., 2010; Zhang et al., 2011)、新葉萌發情形 (Xie et al., 2012)、目測評估法 (Andaya and Tai, 2006; Kim and Tai, 2011; Suh et al., 2011; Wang et al., 2016)、生物代謝物質含量 (脯氨酸、抗壞血酸、穀胱甘肽及丙二醛等) (Kim and Tai, 2011; Zhang et al., 2011) 及酵素活性 (POD、SOD、CAT 及 APX 等抗氧化酵素) (Bonnecarrere et al., 2011)，而其中以目測評估法為大宗。目測評估法主要可分為葉片顏色評估、葉片生長狀況評估及葉片綜合評估三種。葉片顏色目測評估主要依據 IRRI 的水稻標準評估系統中耐寒性評估，將植株顏色分成以下等級: 1 = 暗綠; 3 = 亮綠; 5 = 黃色; 7 = 褐色; 9 = 植株死亡 (IRRI, 2002)。葉片生長狀況評估則將耐寒性以葉片生長狀況區分為兩個級距: 1-3 = 耐寒、葉片正常、無明顯可見傷害; 4-9 = 低溫敏感、葉片萎凋、植株死亡 (Suh et al., 2011)。而綜合性評估則結合了兩者，將耐寒性檢定分級成以下標準: 1 = 葉呈綠色，無捲縮、變橙黃色現象(抗); 3 = 第 1 葉及心葉部分呈呈黃色或捲縮(中抗); 5 = 第 1 葉及心葉全部變黃(中感); 7 = 全株呈橙黃色，葉捲曲，植株枯萎(感); 9 = 植株死亡(極感) (鄭等人，2019)。

目測評估法雖然簡單、直觀，但其評估過程牽涉評估者主觀判斷，尤其是在中間值的判斷上較難保持一致，可能影響評估結果的準確性。因此有學者建議應採用高通量外表型檢定技術，例如圖像分析方法，或以儀器測量生理指標進行耐寒性評估，以確保評估準確性 (Yang et al., 2014)。



三、水稻苗期耐寒性之相關 QTL

Najeeb et al. (2021) 彙整截至目前已知的水稻耐寒性 QTL 共有 578 個，其中有 249 個 QTL 與苗期耐寒性相關 (表一)。苗期耐寒性相關 QTL 中，有 159 個 QTL 由兩親本雜交族群之 QTL 研究所發現，另外 90 個 QTL 則為全基因體關聯性分析 (GWAS) 所發現。這 249 個 QTL 的外表型變異解釋程度在 4.51%至 60.96%之間，其中包含 15 個外表型變異解釋程度大於 30%的主效 QTL，座落於第 4、6、7、8、11 及第 12 條染色體上。

表一、Najeeb et al. (2021)彙整水稻苗期耐寒性相關 QTL 研究結果列表

Table 1. Research results for rice low temperature tolerance at seedling stage related QTL in Najeeb et al. (2021)

Mapping population	QTL no.	Chromosome	PVE (%)	Reference
RILs	15	1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12	8.7-41.7	(Andaya and Mackill, 2003b)
F _{2:3}	6	6, 8, 11, 12	7.2-14.9	(Biswas et al., 2007)
ILs	3	1, 7, 11	6.5-9.5	(Cheng et al., 2012)
RILs	12	4, 6, 9	9.1-37.1	(Wang et al., 2009)
F _{2:3}	12	1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 12	5.6-42.9	(Han et al., 2004)
DHs	5	1, 2, 4, 10, 11	11.8-21.5	(Ji et al., 2010)
RILs	3	1, 5, 6	9.1-24.1	(Jiang et al., 2008)
RILs	6	1, 2, 4, 10, 11	6.1-16.5	(Kim et al., 2004)
F _{2:3}	7	1, 2, 5, 6, 7, 10	8.0-20.0	(Liu et al., 2013)
DHs	6	1, 2, 8	6.4-27.4	(Lou et al., 2007)
RILs	2	1, 4	7.5-16.0	(Park et al., 2013)
RILs	9	2, 5, 6, 7, 8	5.8-35.6	(Ranawake et al., 2014)
RILs	5	3, 8, 11, 12	5.5-22.4	(Wang et al., 2011)
F ₃	7	1, 2, 5, 8, 10	-	(Yang et al., 2013b)
RILs	36	2, 3, 6, 7, 9, 10	4.5-35.4	(Yang et al., 2018)
BILs	5	4, 8, 12	8.8-60.9	(Yu et al., 2018)
RILs	15	1, 6, 7, 8, 9, 11, 12	5.0-23.1	(Zhang et al., 2014b)
RILs	5	3, 7, 11	5.5-29.8	(Zhang et al., 2005)
GWAS	67	1-11	3.8-8.2	(Wang et al., 2016)
GWAS	23	1-6, 10-12	3.1-13.2	(Zhang et al., 2018b)

RIL: Recombinant Inbred Line; IL: Introgression Lines; BIL: Backcross Inbred Line; DH: Double Haploid;

GWAS: Genome-Wide Association Study



四、水稻苗期耐寒性相關基因及遺傳分子調控機制

Najeeb et al. (2021) 彙整 OGRO database 結果發現，相較於已發表的水稻苗期耐寒性 QTL (249 個)，截至目前已知的水稻苗期耐寒性相關基因僅有 35 個 (表二)，其中有 10 個基因 (*OsCOIN*、*OsGSK1*、*OsGH3-2*、*OsMYB3R-2*、*OsTPP1*、*ZFP182*、*OsCAF1B*、*OsiSAP8*、*OsbZIP52* 及 *OsAsr1*) 同時與發芽期或抽穗期的耐寒性相關。就基因功能而言，此些基因主要與離層酸 (ABA) 訊號傳導、鈣離子訊號傳導、滲透調節物質累積與轉錄因子功能相關，以下就研究較完整的水稻苗期耐寒性遺傳分子調控機制進行分述：

(一) ABA 訊號傳導

環境低溫會誘導水稻植株內 ABA 開始大量累積，使具有 ABA-responsive element (ABRE) 的 *NAC* 基因開始表現。ABRE 為一段位於基因啟動子的 G-box 序列 (CACGTG) (Kim et al., 2004)，而 *NAC* (NAM-ATAF1,2-CUC2) 基因則是 C 端序列多樣化的轉錄因子，有調控 *NACRS* (NAC recognition site) 基因表現之功能，會進而調控下游 *COR* (cold-responsive) 基因表現，以調節水稻苗期耐寒性 (Hu et al., 2008)。

(二) 鈣離子訊號傳導

植物細胞膜上具有環核苷酸鈣離子通道 (Finka et al., 2012)，在植物遭遇低溫時會受誘導而使鈣離子湧入細胞內。這項訊號會誘導 CDPKs (calcium-dependent protein kinase) 表現 (Saijo et al., 2000)，進而誘導 MYB 家族之轉錄因子表現，調控下游 DREBs-CRT/DRE (dehydration-responsive element-binding proteins-C-repeat/dehydration-responsive elements) 之耐寒反應途徑。DREBs-CRT/DRE 則是最廣為研究的耐寒反應途徑 (Su et al., 2010)，其中 DREBs 屬於 AP2/EREBP (*APETALA2*/ethylene response factor) 轉錄因子家族，水稻中共有 7 個 DREBs 基因，包含 *OsDREB1A/CBF3*、*OsDREB1B/CBF1*、*OsDREB1C/CBF2*、*OsDREB1D*、



OsDREB1F、*OsDREB2A* 以及 *OsDREB2B* 均與耐寒反應相關 (CBF: C-repeat/dehydration-responsive element-binding factor)。DREBs 轉錄因子會與 GCC-box 及 CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive elements) 結合，調控下游 *COR* 基因表現，改變細胞膜透性、累積滲透調節物質、調節荷爾蒙及清除活化氧族，從而增進水稻耐寒性 (Zhang et al., 2013)。

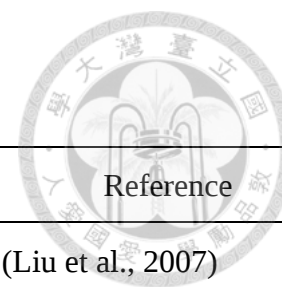
(三) 活化氧族訊號傳導

低溫環境會導致水稻植株細胞內活化氧族的累積增加，進而啟動 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 級聯反應。此級聯反應由三個成分構成，分別為 MAPK、MAPKK (MAPK kinase) 及 MAPKKK (MAPKK kinase)。而在 MAPK 級聯反應中 MAPK4 與 MAPK6 被證實與水稻苗期低溫與鹽害逆境的調控相關 (Kumar et al., 2008)。MAPK 級聯反應會誘導下游 *COR* 基因表現，從而調節水稻耐寒性。

表二、水稻苗期耐寒性相關基因列表(修改自 Najeeb et al. (2021))

Table 2. Rice cold tolerance at seedling stage related genes modified from Najeeb et al. (2021)

Chromosome	Gene	Expression location	Gene function	Reference
01	<i>OsCOIN</i>	根部、莖部、葉片及花穗	低溫誘導鋅指蛋白，提升耐寒、耐鹽、耐旱	(Liu et al., 2007)
01	<i>OsGSK1</i>	葉節、維管束及幼穗	樣肝醣合成酶激酶，壓力反應相關	(Koh et al., 2007)
01	<i>OsaMIR319b</i>	劍葉	增加葉片寬度	(Yang et al., 2013a)
01	<i>OsMKK6</i>	葉片	水稻絲裂原活化蛋白激酶 6，提升耐寒、耐鹽	(Kumar et al., 2008)
01	<i>OsaMIR319a</i>	劍葉	增加葉片寬度	(Yang et al., 2013b)
01	<i>OsGH3-2</i>	根、莖、葉及花穗(表現量小)	調控離層酸、生長素水平應對低溫、乾旱逆境	(Greco et al., 2012)
01	<i>OsMYB3R-2</i>	根、莖節、葉片、花及種子	提升 G2/M phase 轉錄量相關轉錄因子	(Ma et al., 2009)
01	<i>SNAC2</i>	根、莖、莖節、葉鞘、葉舌	壓力反應相關乙醯半胱氨酸基因，提升保衛細胞耐寒、耐鹽	(Hu et al., 2008)
01	<i>OsNAC6</i>	葉片	NAM-ATAF-CUC 家族轉錄因子，提升耐寒、耐鹽、耐旱及稻熱病抗性	(Nakashima et al., 2007)
01	<i>OsDREB1F</i>	根、葉片、花穗及癒傷組織	乾旱反應轉錄因子 1F	(Wang et al., 2008)
02	<i>ASR3</i>	根及葉片	乾旱反應離層酸表現相關蛋白，調控荷爾蒙、糖類訊號提升耐寒及耐旱性	(Joo et al., 2013)



02	<i>OsTPP1</i>	兩週大幼苗	6-磷酸海藻糖磷酸酶 1。儲存糖分提升耐寒耐旱、耐鹽	(Ge et al., 2008)
03	<i>Osv1</i>	未成熟幼葉	葉綠體蛋白 NUS1。調控葉綠體 RNA 生化代謝	(Zhang et al., 2011)
03	<i>OsHOS1</i>	兩週大幼苗	E3 泛素連接酶，參與蛋白酶體相關耐寒反應	(Lourenço et al., 2013)
03	<i>ZFP182</i>	兩週大幼苗	TFIIIA 型鋅指蛋白 182，與滲透調節物質相關	(Huang et al., 2012)
03	<i>OsCIPK03</i>	兩週大幼苗	類鈣調磷酸酶 B 蛋白，增加脯胺酸、可溶性糖累積	(Xiang et al., 2007)
04	<i>OsCAF1B</i>	三週大幼苗	水稻分解代謝物抑制酶 4	(Chou et al., 2014)
04	<i>COLD1</i>	葉片	離層酸訊號傳遞	(Ma et al., 2015)
05	<i>OsWRKY45</i>	葉片	離層酸訊號傳遞	(Tao et al., 2011)
05	<i>OsLti6b</i>	幼苗、花器	疏水蛋白	(Jiang et al., 2008)
05	<i>OsTPS1</i>	兩週大幼苗	海藻糖、脯氨酸累積增加	(Li et al., 2011)
05	<i>OsRAN2</i>	兩週大幼苗	GTP 酶，與細胞循環中 RNA、蛋白輸導有關	(Chen et al., 2011)
06	<i>OsDREB1C</i>	17 天大幼苗	乾旱反應轉錄因子 1C	(Ito et al., 2006)
06	<i>OsSPX1</i>	一週大幼苗	磷酸訊號傳導相關	(Wang et al., 2013)
06	<i>OsiSAP8</i>	一週大幼苗	SAP 基因，於非生物逆境下根部、孕穗期花穗有高轉錄量	(Kanneganti and Gupta, 2008)



06	<i>OVP1</i>	10 天大幼苗	液胞焦磷酸酶，提升丙二醛、脯氨酸含量	(Zhang et al., 2011)
06	<i>OsZIP52</i>	兩週大幼苗及開花後兩天植株	白胺酸拉鍊 52，對耐旱、耐寒具負調控功能	(Liu et al., 2012)
07	<i>CRTintP1</i>	葉鞘	鈣網蛋白，參與訊號傳導	(Komatsu et al., 2007)
08	<i>OsDEG10</i>	17 天大幼苗	RNA 結合蛋白	(Park et al., 2009)
08	<i>Oscrr6</i>	三週大幼苗	與 NDH 循環式電子傳遞鏈相關	(Yamori et al., 2011)
09	<i>OsWRKY76</i>	兩週大幼苗	耐寒、抗稻熱病	(Yokotani et al., 2013)
09	<i>OsDREB1A</i>	17 天大幼苗	乾旱反應轉錄因子 1C	(Ito et al., 2006)
09	<i>OsPIP2</i>	根、葉片	細胞膜內鑲蛋白，與水分輸導相關	(Li et al., 2008)
10	<i>MYBS3</i>	一週大幼苗	MYB 轉錄因子	(Su et al., 2010)
11	<i>OsAsr1</i>	葉片、花藥	乾旱反應 C-repeat 轉錄因子 1	(Kim et al., 2009)
11	<i>ASR1</i>	根、葉片	壓力反應離層酸調控相關蛋白	(Joo et al., 2013)

COIN: cold-inducible; GSK: glycogen synthase kinase; MIR: micro RNA; MKK: mitogen-activated protein kinase; GH: glycosyl hydrolase; MYB: myelobastosis; SNAC: stress-responsive NAC; ASR: ABA stress ripening; TPP: tripeptidyl peptidase; v: virescent; HOS: high expression of osmotically responsive; ZFP: zinc finger; CIPK: calcineurin B-like protein interacting protein kinase; CAF: carbon catabolic repressor 4-associated factor; COLD: chilling-tolerance divergence; TPS: trehalose-6-phosphate synthase; RAN: RAS-related nuclear protein GTPase; SPX: SYG1/PHO81/XPR1 domain; SAP: stress associated protein; VP: vacuolar H⁺-pyrophosphatase; ZIP: basic leucine zipper; CRTinP: calreticulin interacting protein; DEG: differentially expressed gene; crr: chlororespiratory reduction; PIP: plasma membrane intrinsic protein



材料與方法

一、試驗材料

本研究使用之水稻材料為兩粳稻品種相互雜交所衍生之 $F_{2:3}$ 族群 (連苒廷, 2019), 母本為良質米品種臺南 16 號 (Tainan No.16, 簡稱 TN16), 父本為日本高耐寒酒米品種美山錦 (Miyamanishiki, 簡稱 Mi)。

本研究共種植 104 個 $F_{2:3}$ 品系 (lines), 由於低溫處理場所空間限制, 此些植株於 2021 年 8 月 17 日開始分批育苗後種植於苗盤, 每批材料皆同時種植兩親本及對低溫敏感品種台中秈 10 號作為外表型調查的對照。

二、遺傳背景建構

本研究使用之基因型資料為執行酒米育種研究計畫所調查, 以 110 組 SSR 分子標誌共分析 248 個 F_2 世代個體之基因型 (連苒廷, 2019)。由於 F_2 與 $F_{2:3}$ 世代間譜系資料清楚保留, 故本研究使用 F_2 世代之分子標誌基因型資料建構其遺傳背景。本研究以 R 軟體中 R/qtl 套件將基因型資料匯入, 先以 `est.rf()` 指令計算分子標誌兩兩間互換率, 接著設定最大互換率 0.35、最小 LOD 值 3 為條件以 `formLinkageGroups()` 指令初步區分連鎖群, 再以 `window=8, use.ripple=TRUE, map.function = "kosambi"` 為條件, 並以 `orderMarkers()` 指令初步排列分子標誌順序。隨後以各分子標誌在物理圖譜上位置為基礎, 使用 ASMap 套件中 `breakCross()` 指令先將包含不同染色體的連鎖群分開, 再以 `mergeCross()` 指令將同一條染色體的不同連鎖群串連。接著再以相同條件下的 `orderMarkers()` 指令重新排列各連鎖群上的分子標誌順序, 並以 `switch.order()` 指令作局部調整, 最後得到含有 12 條連鎖群的連鎖圖譜(cM), 分別可對應到水稻的 12 條

染色體，且分子標誌排列順序與物理圖譜(IRGSP-1.0)相符合。在基因頻度方面，本研究使用卡方適合度檢定用以檢測所有個體及各組分子標誌之基因頻度是否符合 F_2 世代理論分布。卡方適合度檢定所得之統計量反映實測值和期望值之間的差距，可用以判斷實測值是否符合理論分布。而在各組分子標誌基因頻度之卡方適合度檢定，由於進行 110 次檢定會有型一錯誤率 (α) 膨脹情形，故使用 Bonferroni 校正，以「 α /檢定次數」取代原先的 α ，避免其過度膨脹。

三、耐寒性外表型調查

本研究耐寒性外表型調查主要參考 IRRI (2002)、鄭等人 (2019)、Kim and Tai (2011)、Suh et al. (2011)及 Wang et al. (2016)之方法。待試驗材料於溫室生長至 3 葉齡時，將該批材料置於 4°C 冰箱中低溫處理 7 天。低溫處理結束後將材料轉移至溫室，經 7-14 天恢復期後進行耐寒性外表型評估。耐寒性外表型檢定以秧苗之葉色是否轉黃、葉尖褪色程度、葉片捲曲與否、存活率及生長勢等，並與該批處理的兩親本表現比較後判別其耐寒性，共分為五個等級(表三)。

表三、水稻苗期耐寒性檢定目測評估表

Table 3. Visual scores for phenotypes of rice low temperature tolerance at seedling stage

Level	Description
1	植株維持綠色，無黃化現象發生
2	與 Mi 耐寒性相似，第 1 葉葉尖黃化
3	第 1 葉、第 2 葉部分黃化；只有第 1 葉完全轉黃
4	第 1 葉完全轉黃、其他葉(非心葉)葉尖黃化；品系同時具有級別 3、級別 5 植株
5	與 TN16 耐寒性相似，第 1 葉完全轉黃，其他葉片、心葉部分黃化



四、QTL mapping

本研究依 *A Guide to QTL Mapping with R/qtl* 一書採用 R 程式語言之 *r/qtl* 套件以多重區間定位法(multiple interval mapping, MIM)進行 QTL 的定位(Broman and Sen, 2009; Broman et al., 2003)。即先以 `read.cross()`指令匯入分子標誌基因型及耐寒性外表型資料，後以 `calc.genoprob()`指令設定在 `step = 1` 條件下估算分子標誌間在每 1 cM 間隔的可能基因型。接著先以 `scanone()`指令採用 Haley & Knott 迴歸方法分析單一 QTL 模型下之 QTL 的可能位置，並以 LOD 值大於 2.5 作為標準，先篩選出 QTL 位置。再將篩選出的 QTL 位置以 `makeqtl()`指令、`fitqtl()`指令建立多個 QTL 的模型，並以 `addint()`指令、`addqtl()`指令檢查是否有交感作用，以及是否有其餘位點可納入模型，最終可得到多個 QTL 之模型、外表型解釋程度、加性效應估計值與顯性效應估計值。而 QTL 之區間估計以 `lodint()`指令使用 LOD 值減去 1.5 之方法進行估算。

五、定序分析

(一) 植株 DNA 萃取

首先製備 DNA 萃取液。先將 114 mg 的 sodium bisulfate 充分溶解於 12.5 ml 的 DNA 萃取緩衝液中(表四)，依序加入 12.5 ml 的核酸溶解緩衝液(表五)及 5 ml 5%的 Sarkosyl solution 混合均勻。接著取 2-3 片(每片約 1 平方公分)樣品葉片置於 1.5 ml 的微離心管中，並加入 0.2 ml 的 DNA 萃取液及 1 粒直徑 3 mm 的鋼珠，使用高通量組織研磨機快速震動 30 秒，重複 2-4 次，直至葉片均質化。葉片磨碎後，加入 0.5 ml 的 DNA 萃取液並混合均勻後，置於 65 °C 水浴槽中靜置 30 分鐘。水浴結束後，於抽氣通風櫃中將每樣品加入 0.6 ml 的氯仿混合液(chloroform : isoamylalcohol = 24:1)，並經手動或機器上下震盪約 100 次後，以 10000 rpm 離心 5 分鐘。離心後於抽氣通

風櫃吸取上層液 (約 0.6 ml)，並混入等體積(約 0.6 ml)常溫的 isopropanol，倒置混合溶液數次後，以 10000 rpm 離心 5 分鐘。離心後將溶液全數倒除，便可見半透明沉澱物於微離心管底部。之後加入 0.2 ml 75%的 ethanol，再以 10000 rpm 離心 5 分鐘。離心後倒除溶液，可使用微量吸管吸除殘留的 ethanol，靜待 ethanol 完全揮發。最後加入適量 TE buffer，靜置於 4°C 冰箱一天，使 DNA 回溶完全 (Fulton et al., 1995)。回溶完成後使用微量分光光度計(Nanodrop)以紫外光吸光值(O.D.值)定量 DNA。讀取樣本在 260nm、280nm 及 230nm 三種波長下之 O.D.值，即可確認 DNA 品質，並可換算為 DNA 濃度，供後續利用。

表四、DNA 萃取緩衝液之配方表

Table 4. Formula of DNA extraction buffer

DNA extraction buffer (500 ml)	
Sorbitol	31.885 g
Tris base	6.055 g
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	0.931 g
pH 值	8.26 (以 HCl 調整)
dd H ₂ O	補至 500 ml

表五、核酸溶解緩衝液之配方表

Table 5. Formula of nuclei lysis buffer

Nuclei lysis buffer (500 ml)	
1M Tris (121.1 g/L)	100 ml
0.25M EDTA (84.05 g/L)	100 ml
5M NaCl (292.2 g/L)	200 ml
CTAB	10 g
pH 值	7.5 (以 HCl 調整)
dd H ₂ O	100 ml



(二) 基因之 DNA 序列引子設計

聚合酶連鎖反應擴增片段為前人研究中與水稻苗期耐寒性相關之基因或 SNP 位點，故將基因體(IRGSP-1.0)中該目標區域及其上下游 200 - 500 bp 之序列輸入 NCBI Primer 設計網站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)，依據黏合溫度與專一性，即篩選得 PCR 引子序列。

(三) 聚合酶連鎖反應及瓊脂膠電泳分析

聚合酶連鎖反應液包括為 2.0 mM forward primer 與 reverse primer 各 1.5 μ L、20 ng/ μ L DNA 樣品 2 μ L 及 2X PCR Polymerase Master Mix (AMPLIQON) 5 μ L，共配成 10 μ L。反應液混合均勻後置入 PCR 熱反應循環器 (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler)進行片段擴增，擴增過程溫度條件依序為以 94°C反應 5 分鐘，再以 94°C反應 30 秒、50~60°C (依據不同引子 C+G 比例而調整)反應 30 秒及 72°C反應 1 分鐘為一個循環，共循環 35 次。循環完成後，最後再以 72°C反應 10 分鐘，結束擴增流程後，將反應產物保存於 4°C冰箱。

瓊脂膠電泳分析則是先將 4 μ L PCR 產物注入 1.5%瓊脂膠片 (Agarose SFR)，以 80V、120 分鐘於充滿 1X TBE buffer 的電泳槽中進行電泳。電泳結束後將膠片置於 0.5 μ L /mL 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr)溶液中震盪染色 5~10 分鐘，接著以清水退染 3~5 分鐘，後將膠片移至紫外燈箱中觀測，拍照以記錄結果。

(四) PCR 產物定序



PCR 產物使用定序儀 (Applied Biosystems 3730xl, 基龍米克斯)以 Sanger 法進行定序，並以 FinchTV 軟體 (Geospiza, Inc.)檢視定序結果各位點訊號，以確保其定序品質後，再進行後續序列比較及分析。



結果

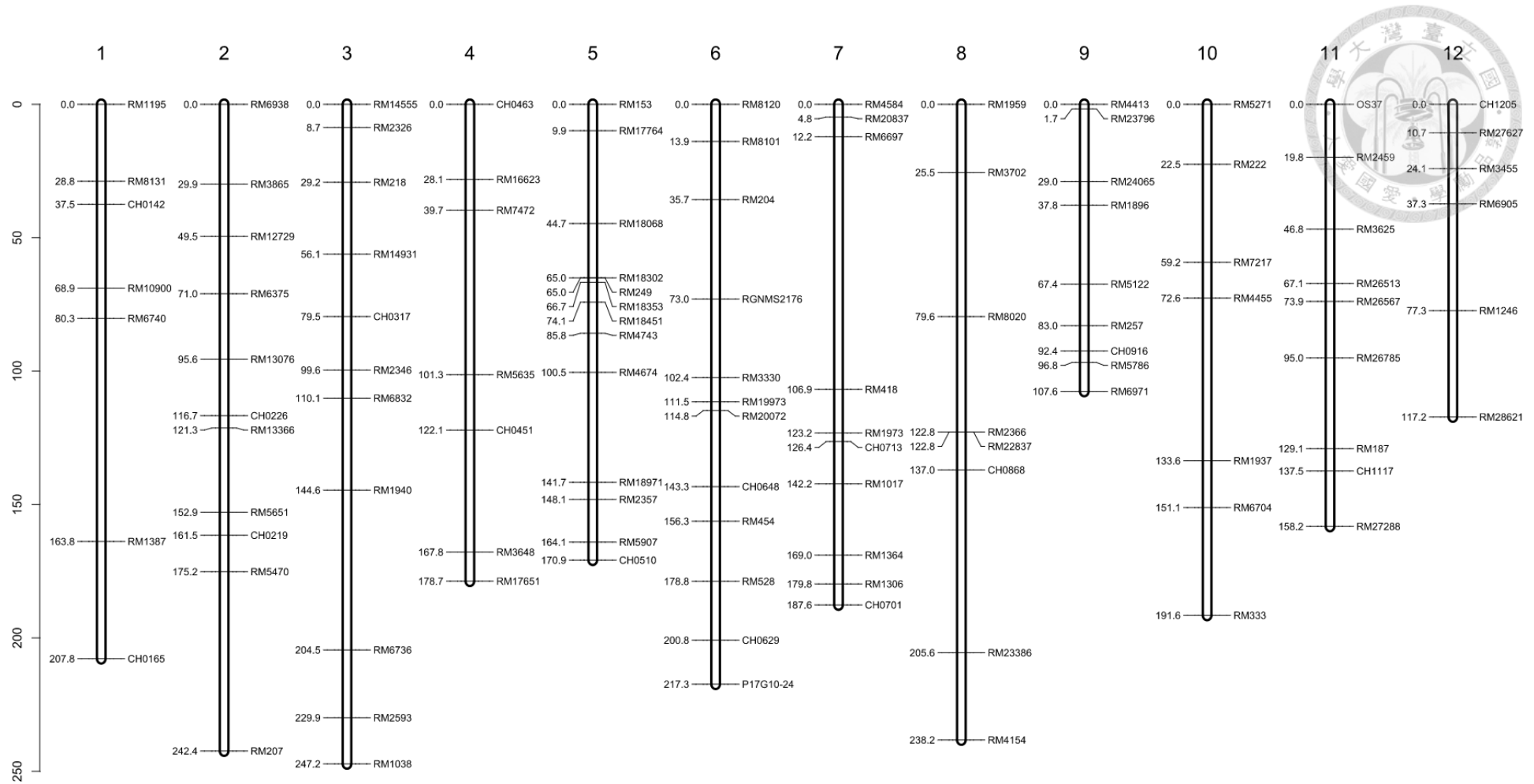
一、連鎖圖譜之建立

本研究使用之分子標誌基因型資料源於試驗族群 F_2 世代 (連苒廷, 2019), 總共包含 110 組具多型性的 SSR 分子標誌, 各染色體上分子標誌之數目如表六所示。在原始資料中 110 組分子標誌被分入 15 個連鎖群, 與栽培稻具有之 12 對染色體數目不相符, 因此本研究參考各分子標誌於 IRGSP-1.0 物理圖譜上位置, 以 R/qtl、ASMap 等 R 軟體套件將 110 組分子標誌依據物理圖譜分別置入 12 個連鎖群, 並確認分子標誌順序與物理圖譜相符合, 最終建立含有 12 個連鎖群, 總長度為 2264.71 cM 及平均間隔為 24.24 cM 的連鎖圖譜 (圖一)。在 12 個連鎖群中, 分子標誌之數目最多的是第 5 對染色體 (具 13 個分子標誌), 最少的是第 12 對染色體 (具 6 個分子標誌); 連鎖群長度最長的是第 3 對染色體的 247.20 cM, 最短的是第 9 對染色體的 107.60 cM; 分子標誌平均間隔最長的是第 1 對染色體的 34.63 cM, 最短的是第 9 對染色體的 13.45 cM。

表六、 F_2 族群連鎖圖譜各染色體分子標誌數目及連鎖群長度

Table 6. The number of molecular markers and the genetic distance of each chromosome on the linkage map constructed by the F_2 population

Chromosome	Number of markers	Total distance (cM)	Average interval (cM)
1	7	207.78	34.63
2	11	242.39	24.24
3	11	247.20	24.72
4	7	178.72	29.79
5	13	170.85	14.24
6	12	217.34	19.76
7	10	187.65	20.85
8	8	238.24	34.03
9	9	107.60	13.45
10	7	191.55	31.93
11	9	158.21	19.78
12	6	117.17	23.43
Total	110	2264.71	24.24



圖一、本研究使用之連鎖圖譜

Figure 1. Linkage map used in this study



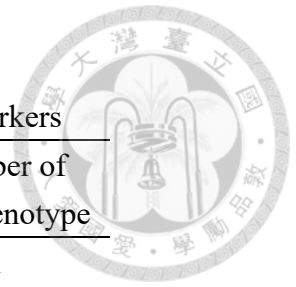
二、 基因型比例分布

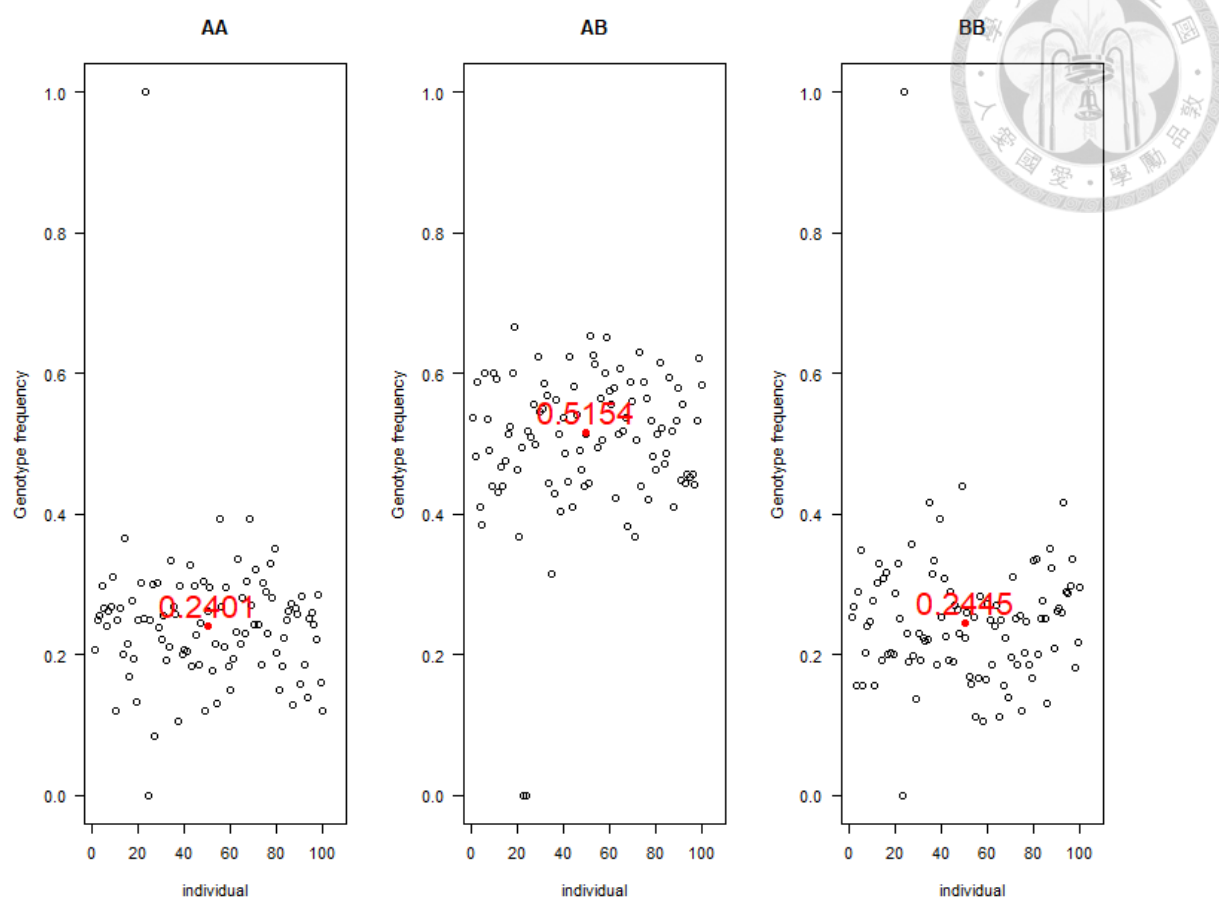
本研究所分析之分子標誌基因型資料源於試驗族群之 F_2 世代，共含有 110 組具多型性之 SSR 分子標誌。其中有 39 組分子標誌於少數個體顯現非兩親本也非異結合之基因型 (表七)，此些位點佔所有基因型位點之 0.99%，僅佔極少數，在後續分析中視為缺值。在所有分子標誌中，僅發現 RM222 為顯性分子標誌，因其美山錦基因型與異結合基因型無法區分；其餘 109 組分子標誌皆為共顯性之分子標誌，在兩親本型及異結合基因型三者均可明確區分。在 F_2 世代依據孟德爾遺傳律理論基因型分布為 1:2:1 (顯性分子標誌則為 3:1)，由圖二可知 F_2 族群基因型頻度符合此分布，以 Bonferroni 校正的卡方適合度檢測各組分子標誌，結果顯示所有 110 組分子標誌皆符合理論基因型比例分布，因此此基因型資料符合理論分布，可使用於後續之分析。

表七、各分子標誌中例外基因型之個數

Table 7. The number of extra genotypes of each molecular markers

Marker	Number of extra genotype	Marker	Number of extra genotype
RM10900	1	RM2593	1
CH0142	3	RM26513	2
CH0317	1	RM26785	1
CH0510	4	RM28621	1
CH0648	1	RM333	2
CH0701	2	RM3455	3
CH0868	8	RM3702	4
CH1205	1	RM3865	4
RGNMS2176	1	RM4154	3
RM1017	1	RM4455	7
RM13076	2	RM5651	1
RM153	3	RM5907	5
RM17764	5	RM6704	4
RM187	2	RM6740	1
RM18971	5	RM6832	5
RM20072	1	RM7472	1
RM204	1	RM8020	6
RM20837	6	RM8120	2
RM2326	4	RM8131	6
RM23386	4	Total	116





圖二、 F_2 族群之分子標誌基因型分布

Figure 2. Distribution of genotypic frequency of molecular markers in the F_2 population



三、 外表型調查及比例分布

(一) 親本外表型調查

本研究調查 TN16 以及 Mi 兩個梗稻品種之苗期耐寒性，其中 Mi 具有較 TN16 更高的耐寒性。兩親本經低溫處理後，依葉片顏色判別，Mi 僅有第一葉葉尖些微黃化，屬苗期耐寒性檢定等級 2；TN16 則第一葉完全轉黃、褐化，屬苗期耐寒性檢定等級 5 (圖三)。除了葉片顏色外，TN16 也顯現出低溫逆境下常見的病徵，包括葉片捲曲、葉片黃化 (chlorosis) 與葉尖枯萎 (圖四)；Mi 則大多症狀輕微，甚至無上述症狀。在耐寒性評估後觀察兩親本後續生長情形，結果如圖五所示，Mi 的株高及根長皆大於 TN16，推測於低溫處理後其生長狀態較佳，可能具有較佳耐寒性，不過此部分仍有待未來試驗證實。

(二) 外表型比例分布

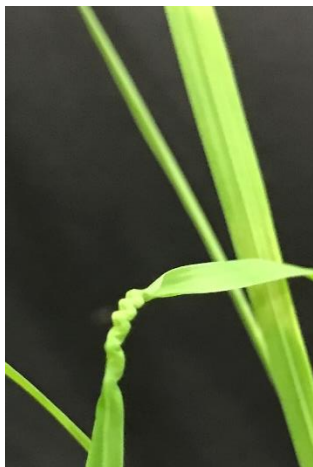
本研究共調查 104 個 Mi × TN16 雜交後代 $F_{2:3}$ 品系之苗期耐寒性，使用目測調查方法，即以葉色及生長勢作為判斷指標，依耐寒性不同共分為 1、2、3、4 及 5 等五個等級，結果如圖六所示。其中，耐寒等級為 2，即與美山錦具相等耐寒性之品系有 27 個；耐寒等級為 3 之品系有 37 個；耐寒等級為 4 之品系有 9 個；耐寒等級為 5 之品系有 31 個。就品系之遺傳背景組成而言，耐寒等級為 2，即與 Mi 具同等耐寒性之品系中有 17 個偏向 Mi，佔 63%；有 10 個偏向 TN16，佔 37%。耐寒等級為 5，即與 TN16 具同等耐寒性之品系中有 10 個偏向 Mi，佔 32%；有 21 個偏向 TN16，佔 68%。耐寒等級為 2 之品系其遺傳背景中有較高的比例來自 Mi，而耐寒等級為 5 之品系其遺傳背景則有較高的比例來自 TN16，與耐寒性等位基因來自 Mi 的推測與觀察相符合。



圖三、經低溫處理後秧苗外表型

(左: Mi、右: TN16)

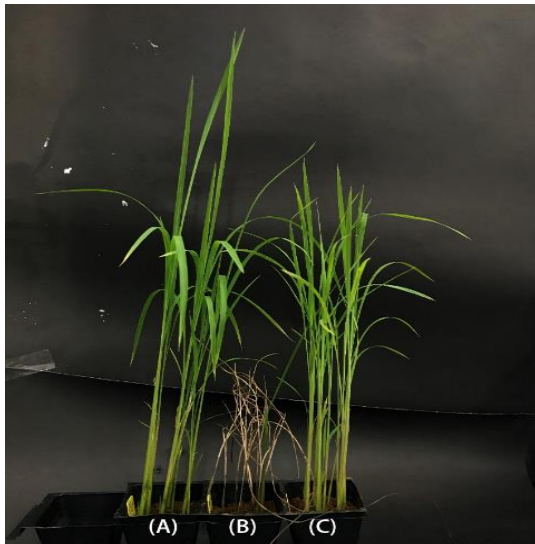
Figure 3. Phenotypes of Mi (left) and TN16 (right) seedlings after low temperature treatment



圖四、TN16 秧苗低溫處理後病徵

(左：葉片捲曲、中：葉片黃化、右：葉尖枯萎)

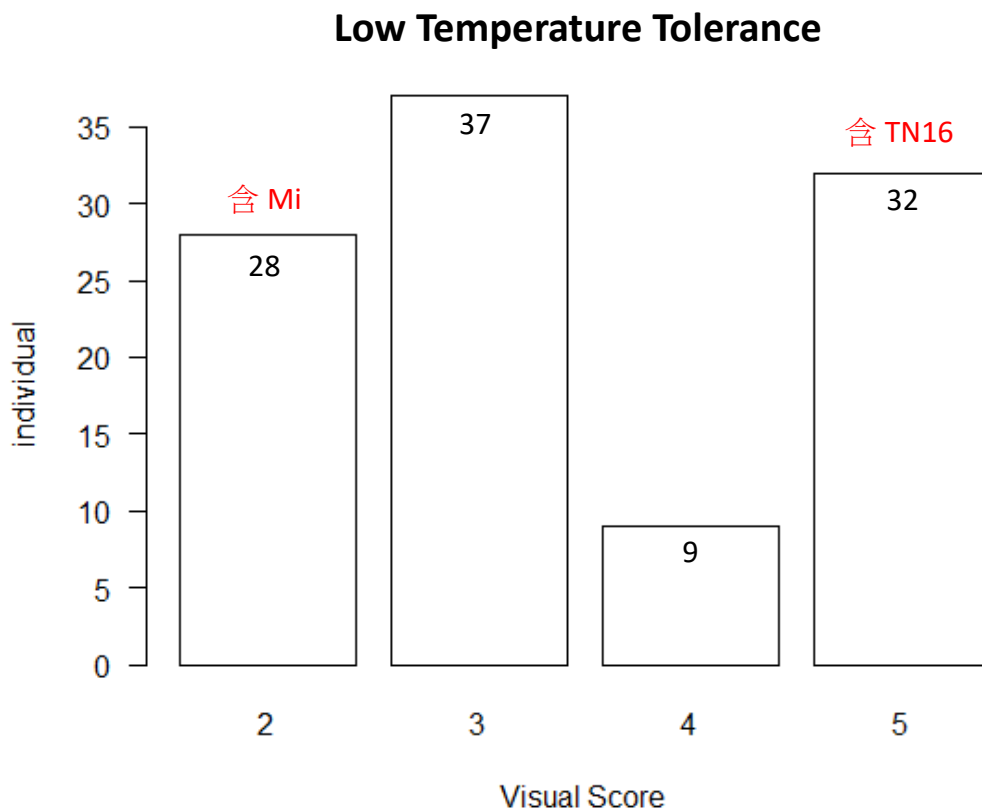
Figure 4. Symptoms of TN16 seedlings after low temperature treatment (left: leaf curling ; middle: leaf yellowing; right: tip wilting)



圖五、三品種經低溫處理後之株高及根長比較

(A: Mi、B: 臺中秈 10 號、C: TN16)

Figure 5. Comparison of plant height and root length among three varieties after low temperature treatment. (A: Mi ; B: Taichung Sen No. 10 ; C: TN16)



圖六、 $F_{2:3}$ 族群之苗期耐寒性外表型的分佈情形(含兩親本)

Figure 6. Distribution of visual score for low temperature tolerance at seedling stage in the $F_{2:3}$ population (2 parental line within)



四、 苗期耐寒性的 QTL 定位及遺傳分析

(一) 苗期耐寒性的 QTL 定位

使用前述的分子標誌基因型資料及耐寒性外表型資料，本研究共定位到 4 個與水稻苗期耐寒性相關的 QTL (表八、圖七)。四個 QTL 分別位於第 2、5、6 與第 7 對染色體上，位於第 2 對染色體的 QTL 代號為 *qLTT-2* (*qLTT* 意指 QTL for low temperature tolerance)，於連鎖圖譜上位於 RM6375 - RM13076 之間，其 LOD 值為 2.65，可解釋 10.89 % 的外表型變異；位於第 5 對染色體的 QTL 代號為 *qLTT-5*，於連鎖圖譜上位於 RM17764 - RM18068 之間，其 LOD 值為 3.09，可解釋 12.55 % 的外表型變異；位於第 6 對染色體的 QTL 代號為 *qLTT-6*，於連鎖圖譜上位於 CH0629 - P17G10-24 之間，其 LOD 值為 3.36，可解釋 13.59 % 的外表型變異；位於第 7 對染色體的 QTL 代號為 *qLTT-7*，於連鎖圖譜上位於 RM1364 - RM1306 之間，其 LOD 值為 2.63，可解釋 10.76 % 的外表型變異。LOD 值最高者為 *qLTT-6*，*qLTT-5* 次之，兩者 LOD 值皆大於 3，且外表型變異解釋程度也高於其他兩 QTL，即具有較大的效應。而此四個 QTL 所建立的多 QTL 模型共可解釋 32.34% 的外表型變異。

(二) 苗期耐寒性的遺傳分析

圖八呈現出分別與四個 QTL 最相鄰的分子標誌其基因型與外表型的分布情形，與 *qLTT-2*、*qLTT-5*、*qLTT-6* 及 *qLTT-7* 依序對應的分子標誌為 RM6375、RM17764、CH0629 及 RM1364，該 QTL 與分子標誌遺傳距離分別為 11.02 cM、15.13 cM、5.16 cM 以及 0.03 cM (表八)。分析 RM6375、RM1364 (*qLTT-2*、*qLTT-7*) 兩分子標誌基因型與外表型，由圖八可見具有 AA (Mi 基因型) 者則具有較低的目測評估等級，即具有較佳的耐寒性；而 AB (異結合) 及 BB (TN16 基因型) 皆具有較高的目測評估等級，即對低溫較敏感，且兩基因型信賴區間重疊而無法區分二者，因此推測此二耐寒性的 QTL 為隱性遺傳，需具有同結合 AA (Mi 基因型) 才會顯現耐寒性，若為 AB (異結



合)或 BB (TN16 基因型)則顯現不耐寒的外表型，就目測評估等級而言，即是 $AA < AB = BB$ 。而分析另兩個分子標誌 RM17764 與 CH0629 (*qLTT-5*、*qLTT-6*)基因型與外表型，由圖八可見具 AA (Mi 基因型)者具有較低的目測評估等級，即具有較佳的耐寒性；AB (異結合)者目測評估等級高於 AA；BB (TN16 基因型)者目測評估等級則再高於 AB 者。AB 與 BB 皆對低溫較敏感，但兩基因型的耐寒程度有所差異，AB 較 BB 更為耐寒，因此推測此二耐寒性 QTL 為加性遺傳模式，來自 Mi 的基因型 A 會貢獻耐寒性，來自 TN16 的基因型 B 則不具耐寒性，就目測評估分數而言即是 $AA < AB < BB$ 。

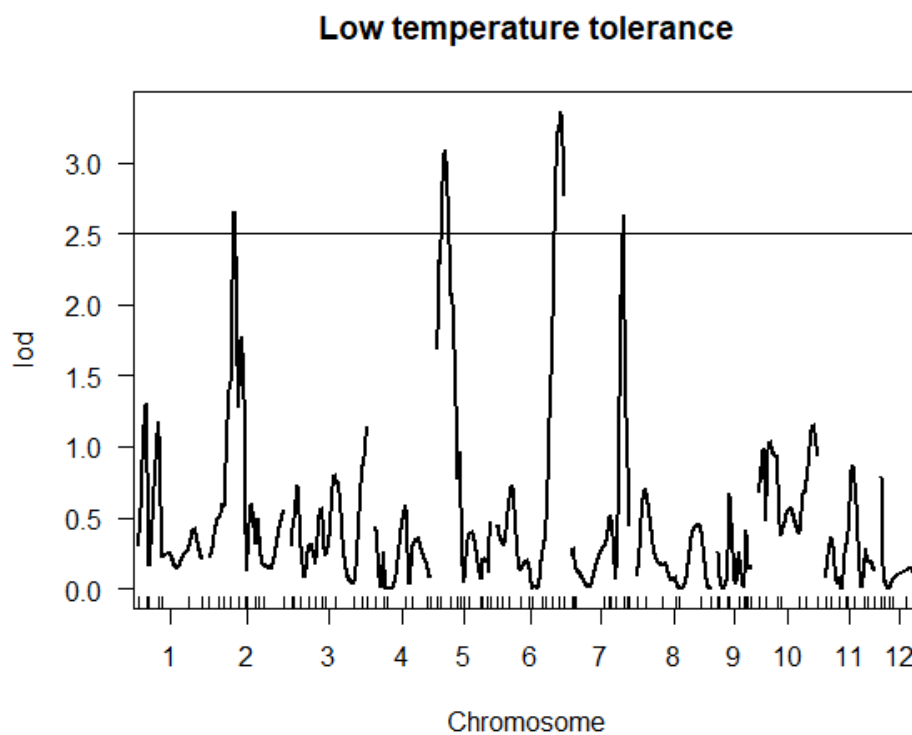
由於此四個 QTL 之間無交感作用，以建立之多 QTL 模型 ($Y \sim Q1 + Q2 + Q3 + Q4$)進一步估計其加性效應與顯性效應。結果顯示(表九)，*qLTT-5* 及 *qLTT-6* 的加性效應最高，且顯性效應為負值，符合前述 LOD 值最高的結果，以及加性遺傳模式的推論；*qLTT-2* 及 *qLTT-7* 的加性效應較低，且具有較高的顯性效應，亦符合前述的結果及隱性遺傳模式的推論。

將效應較大的 *qLTT-5* 及 *qLTT-6* 視為兩個主效 QTL，並假設此試驗族群苗期耐寒性主要由此二 QTL 所控制，且把外表型區分為「耐寒」(目測評估等級 2)、「中間型」(目測評估等級 3、4)、「不耐寒」(目測評估等級 5) 三等級。此三等級扣除兩親本後比例為 27 : 46 : 31，與 $F_{2:3}$ 族群理論分離比 21 : 22 : 21 (AAAA、AAAB、ABAA : ABAB、AABB、BBAA : BBBB、BBAB、BBBB)以卡方適合度檢定後，顯示兩者無顯著差異，說明所調查之實際外表型分離比例與理論分離比相符合。

表八、 $F_{2:3}$ 族群苗期耐寒性的數量性狀基因座及其外表型貢獻量

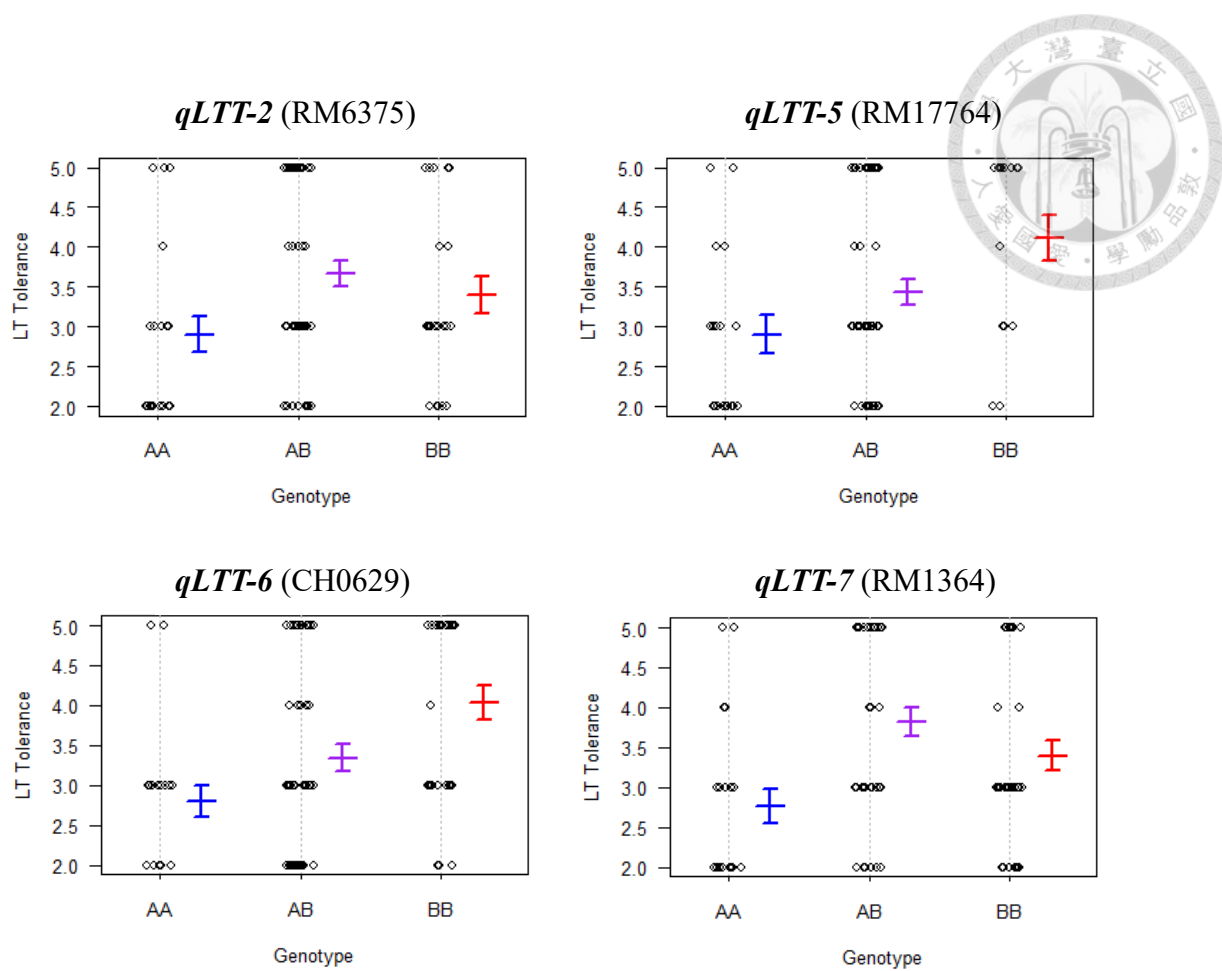
Table 8. QTL and their phenotypic contribution for rice low temperature tolerance at seedling stage in the $F_{2:3}$ population

QTL	Chromosome	Distance to the closest marker (cM)	Interval	LOD	PVE (%)
<i>qLTT-2</i>	2	11.02	RM6375 - RM13076	2.65	10.89
<i>qLTT-5</i>	5	15.13	RM17764 - RM18068	3.09	12.55
<i>qLTT-6</i>	6	5.16	CH0629 - P17G10-24	3.36	13.59
<i>qLTT-7</i>	7	0.03	RM1364 - RM1306	2.63	10.76
4 QTL model	-	-	-	8.99	32.34



圖七、 $F_{2:3}$ 族群苗期耐寒性的數量性狀基因座定位

Figure 7. QTL mapping for rice low temperature tolerance at seedling stage in the $F_{2:3}$ population



圖八、四個最靠近 QTL 的分子標誌其基因型與外表型之分佈

Figure 8. Phenotypic distribution of low temperature tolerance at seedling stage for genotypes of markers closest to each four QTL

表九、苗期耐寒性相關 QTL 之加性效應與顯性效應

Table 9. Additive and dominant effects of 4 QTL related to low temperature tolerance at seedling stage

QTL	Chromosome	Additive effect	Dominant effect
<i>qLTT-2</i>	2	0.28	0.64
<i>qLTT-5</i>	5	0.51	- 0.14
<i>qLTT-6</i>	6	0.46	- 0.18
<i>qLTT-7</i>	7	0.12	0.55
Intercept		3.41	



五、 苗期耐寒性相關 QTL 之定序分析

(一) 苗期耐寒性相關 QTL 的定序位置

將本研究定位到四個 QTL 的區間估計，在其上下界最近分子標誌的物理圖譜位置作為此四 QTL 物理圖譜上的可能區間，並檢索前人研究在此區間中是否有水稻苗期耐寒性相關的基因或 DNA 序列變異 (表十)。結果顯示 *qLTT-5* 及 *qLTT-6* 兩 QTL 的區間估計內分別有 *OsLti6b* 及 *OsZIP52* 兩個水稻苗期耐寒性相關基因(Jiang et al., 2008; Liu et al., 2012)；而在 *qLTT-2*、*qLTT-5* 及 *qLTT-7* 區間內皆存在與苗期耐寒性相關的 SNP 位點 (Wang et al., 2016)；而另一水稻種原苗期耐寒性的 GWAS 研究結果中發現有一 SNP 位點位於 *qLTT-5* 區間內 (Zhang et al., 2018b)。選殖基因具有完整序列資訊且基因功能經前人研究證實，與水稻苗期耐寒性直接相關；GWAS 所得之 SNP 位點則不一定位於外顯子序列，且顯著位點可能是受到演化或親緣關係導致，是否與水稻苗期耐寒性具有實際關聯，仍有待後續研究證實。本研究以這些已知基因 (基因序列與啟動子序列)或 SNP 位點共 8 個位置，由於定序結果前 50 bp 訊號易混雜，故以上下游 200 bp 為範圍而設計 PCR 引子，期望探討兩親本間這些耐寒性基因之 DNA 序列差異 (表十一)。

(二) *qLTT-2* 定序分析

Wang et al. (2016)水稻種原苗期耐寒性的 GWAS 結果中，有一耐寒性相關 SNP 位點 *qCTS2-3* 位於第 2 條染色體的 15096404 bp 位置，落在本研究定位到的 *qLTT-2* 區間內。以該位點上下 200 bp 範圍設計了一組 PCR 引子進行片段擴增後定序，定序結果顯示該組引子擴增之片段在兩親本間於該 SNP 位置無差異，表示本研究之耐寒性與此基因應無關。



(三) *qLTT-5* 定序分析

根據 Jiang et al. (2008)測定水稻苗期耐寒性相關 QTL 之結果，有一耐寒基因 *OsLti6b* 位於第 5 條染色體的 2219670 -2220840 bp 位置 (總長 1171 bp)，落在本研究定位到的 *qLTT-5* 區間內。同樣以該基因上下 200 bp 範圍而設計了兩組預期擴增整段基因的引子進行 PCR 分析及定序，定序結果顯示兩親本之擴增片段(共 1468 bp)無序列差異，即本研究之耐寒性與 *OsLti6b* 基因無關。

在確定兩親本的 *OsLti6b* 基因的外顯子與內含子的 DNA 序列無差異後，本研究進一步探討該基因的啟動子區域，於是將 *OsLti6b* 基因前 1000 bp 範圍視為啟動子區域，設計了兩組預期擴增整段啟動子範圍的引子進行 PCR 分析後定序，定序結果顯示兩親本擴增片段(共 1469 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與 *OsLti6b* 基因啟動子序列無關。

而據 Wang et al. (2016)之 GWAS 研究結果，發現有三個水稻苗期耐寒性相關 SNP 位點 *qCTS5-1*、*qCTS5-2* 及 *qCTS5-3* 分別位於第 5 條染色體的 1970193、6171822 及 8040996 bp 位置，落在本研究定位到的 *qLTT-5* 區間內。因此以上述三位點上下 200 bp 範圍各設計了一組 PCR 引子進行片段擴增後定序，定序結果顯示兩親本之三組擴增片段 (165 bp、195 bp、178 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與此三 SNP 位點無關。

而據 Zhang et al. (2018b)之 GWAS 研究結果，發現有一個水稻苗期耐寒性相關 SNP 位點 *qCTSD5-1* 位於第 5 條染色體的 2498170 bp 位置，落在本研究定位到的 *qLTT-5* 區間內。以該位點上下 200 bp 範圍各設計了一組引子進行 PCR 分析後定序，結果顯示兩親本擴增片段 (336 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與此 SNP 位點無關。



(四) *qLTT-6* 定序分析

根據 Liu et al. (2012) QTL 分析結果，有一水稻苗期耐寒性相關基因 *OsbZIP52* 位於第 6 條染色體的 27299966 -27302123 bp 位置 (總長 2158 bp)，落在本研究定位到的 *qLTT-6* 區間內。以該基因上下 200 bp 範圍設計了兩組預期擴增整段基因的引子進行 PCR 分析後定序，結果顯示兩親本擴增片段(共 1672 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與 *OsbZIP52* 基因無關。

在確定兩親本 *OsbZIP52* 基因外顯子與內含子 DNA 序列無差異後，本研究進一步探討該基因的啟動子區域，於是將 *OsbZIP52* 基因前 500 bp 範圍視為啟動子區域，以其上下 200 bp 範圍設計了一組預期擴增整段啟動子區域的引子進行 PCR 分析後定序，定序結果顯示兩親本擴增片段 (812 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與 *OsbZIP52* 基因啟動子序列無關。

(五) *qLTT-7* 定序分析

據 Wang et al. (2016) GWAS 研究結果，發現有一水稻苗期耐寒性 SNP 位點 *qCTS7-4* 位於第 7 條染色體的 23783174 bp 位置，落在本研究定位到的 *qLTT-7* 區間內。以該位點上下 200 bp 範圍設計了一組引子進行 PCR 分析後定序，結果顯示，兩親本擴增片段(335 bp)間無 DNA 序列差異，即本研究之耐寒性與此 SNP 位點無關。

表十、苗期耐寒性所定位的 QTL 位置、估計區間及位置有重疊的前人研究

Table 10. Mapped position, estimated interval, and previous studies with overlapping QTL intervals

QTL	Chromosome	Position (cM)	Estimated interval (cM)	Physical map (Mb)	Previous studies
<i>qLTT-2</i>	2	82	59 – 117 (RM12729 - CH0226)	6.74 - 19.18	(Han et al., 2004; Kim et al., 2014; Wang et al., 2016; Yang et al., 2018; Yang et al., 2013b)
<i>qLTT-5</i>	5	25	0 - 58 (RM153 - RM18302)	0.18 - 12.78	(Jiang et al., 2008; Kim et al., 2007; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2018b)
<i>qLTT-6</i>	6	206	180 – 217 (RM528 - P17G10-24)	26.55 -30.97	(Liu et al., 2012; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2014b)
<i>qLTT-7</i>	7	169	154 – 179 (RM1017 - RM1306)	22.55 -28.95	(Han et al., 2004; Wang et al., 2016; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2014b)

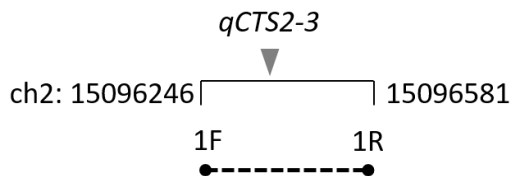
表十一、本研究 QTL 區間中水稻苗期耐寒相關之已知基因與 SNP 位點片段擴增之引子列表

Table 11. List of primers used for the amplification of previously studied genes and SNPs in 4 QTL intervals

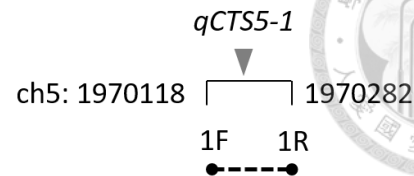
QTL	Previous studies	Primer	Primer (5' → 3')	G+C (%)	Tm (°C)
<i>qLTT-2</i>	<i>qCTS2-3</i> (Wang et al., 2016)	1F	TCGACGTTTCTTCGACTGAT	45	59
		1R	TTAGAAGGGCAAGGAGCAAA	45	59
<i>qLTT-5</i>	<i>OsLti6b</i> (Jiang et al., 2008)	1F	GATCATTTTCGACGCGAAGGC	55	60
		1R	TCGATTTCACTACTTCACCTTGAG	42	58
		2F	TTCCTCAAGTTCGGATGCGG	55	60
		2R	TATGATCCAAGTTGATGCTCCTT	39	58
		3F	ACTTGCTTCCCTGTCTGTCTG	52	60
		3R	CTGTCCATAGCGTAGTGCGT	55	60
		4F	GCTTGAGACTTGCTTCCCTG	55	59
		4R	TGTCCATAGCGTAGTGCGTG	55	60
	<i>qCTS5-1</i> (Wang et al., 2016)	1F	AGTTGTTCCAGAGTCTATTCCGT	43	59
		1R	TTGGCTGCGATTTCATAGCTG	48	59
	<i>qCTS5-2</i> (Wang et al., 2016)	1F	TACAGGAACAACGTTGGCGA	50	60
		1R	TACCATGCACTTGCCCTACC	55	60
	<i>qCTS5-3</i> (Wang et al., 2016)	1F	CCGTTCCCCTCTCAAATTGC	55	59
		1R	ATGAAGAACCAAGTGGGCAGT	48	60
	<i>qCTSD5-1</i> (Zhang et al., 2018)	1F	ATGCCACTCTCCATTCAAGTAAA	39	58
		1R	CACTGTGTCACCTGTCTTTCC	52	59
<i>qLTT-6</i>	<i>OsZIP52</i> (Liu et al., 2012)	1F	TTTGGTTGCAGATGACCCCA	50	60
		1R	GGCTGAAGGAGAGTTTGGTTTC	50	59
		2F	AGAAACCAAACCTCTCCTTCAGC	45	59
		2R	AGTGGCACATTTACACCGA	50	60
		3F	TGTTGGACGTAGGTTGGAGC	55	60
		3R	GTTCTTGGCGTAGCTCTGGT	55	60
<i>qLTT-7</i>	<i>qCTS7-4</i> (Wang et al., 2016)	1F	TGGCCGTCTGATCTTGGATG	55	60
		1R	TTAGTGATGGAACACCCGCC	55	60



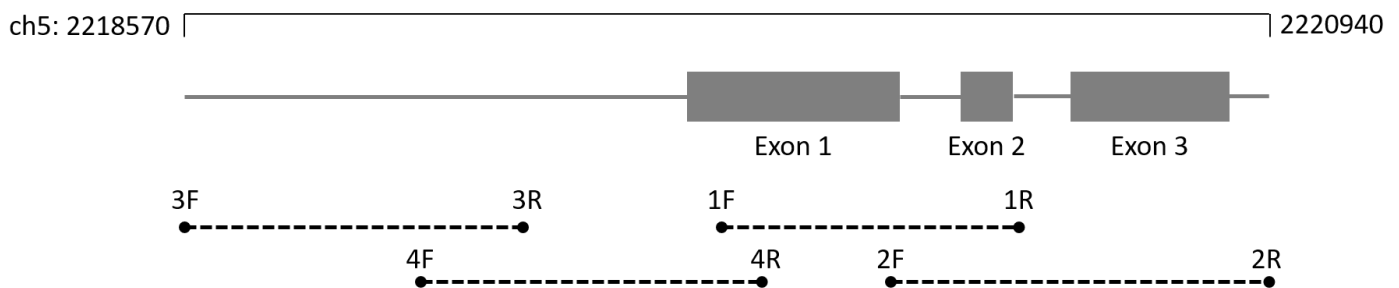
(A) *qCTS2-3* in *qLTT-2* interval



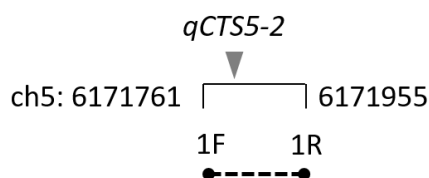
(B) *qCTS5-1* in *qLTT-5* interval



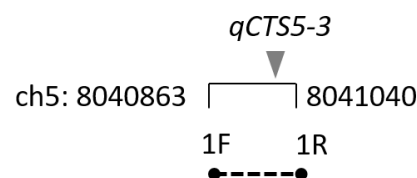
(C) *OsLti6b* in *qLTT-5* interval



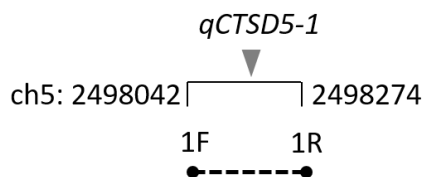
(D) *qCTS5-2* in *qLTT-5* interval



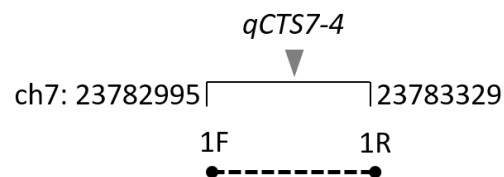
(E) *qCTS5-3* in *qLTT-5* interval



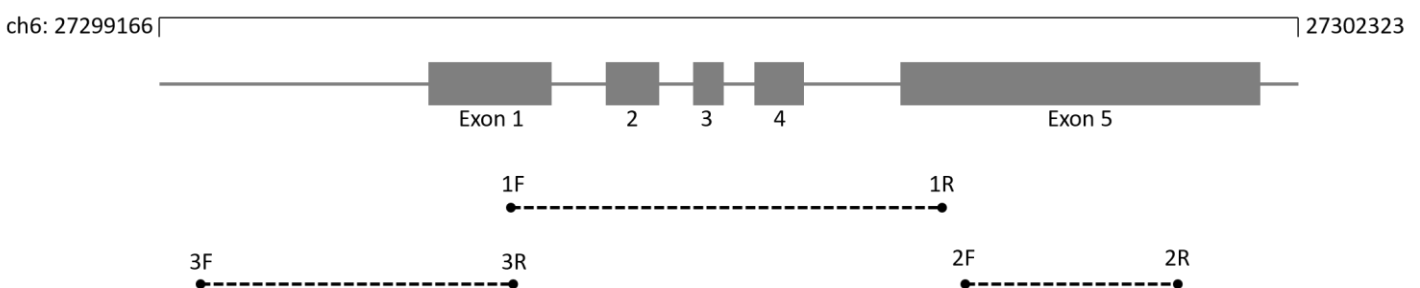
(F) *qCTSD5-1* in *qLTT-5* interval



(G) *qCTS7-4* in *qLTT-7* interval



(H) *OsZIP52* in *qLTT-6* interval



圖九、本研究 QTL 區間中水稻苗期耐寒相關之已知基因與 SNP 位點片段擴增之引子位置示意圖。實心長方形表示 exon，實線表示 intron，下方虛線表示引子對及擴增範圍。

Figure 9. Locations of primers used to amplify previously studied genes and SNPs in 4 QTL intervals. Shaded boxes represent exons and solid lines represent introns. Dotted lines below represent the regions amplified with primers used to confirm the sequences



討論

一、連鎖圖譜之建立

建立連鎖圖譜為數量性狀基因座定位 (QTL mapping) 的首要工作，其中分子標誌的數目、密度及分布等因素皆對後續 QTL 定位與分析結果有所影響。本研究之連鎖圖譜由 110 組 SSR 分子標誌分析雜交後代 F_2 世代族群之基因型資料所建構，全長共 2264.71 cM，分子標誌平均間隔為 24.24 cM，其中有 8 個相鄰分子標誌間隔大於 50 cM 者，分別位於第 1、2、3、4、7、8 及第 10 對染色體上。本研究連鎖圖譜有 8 處間隔大於 50 cM，不過本研究定位之 4 個水稻苗期耐寒性的 QTL 均非位於此 8 處，因此並不影響定位的準確度。唯此 8 處相鄰分子標誌遺傳距離大於 50 cM，可能遺漏水稻苗期耐寒性 QTL。此外，由於次世代定序 Genotyping-By-Sequencing (GBS) 成本下降且定序分析技術趨於成熟，使用不同系統的高通量分子標誌 (如: SNP、GBS 等) 來建構連鎖圖及譜定位 QTL，亦是目前水稻遺傳研究經常使用的方法。例如，Baltazar et al. (2019) 以 IR64 $\times$ Kharsu 80 的 F_2 族群分析 217 個 SNP marker 建構全長 1553.5 cM 且平均間隔 7.6 cM 的連鎖圖譜；Satrio et al. (2021) 以 IR64 $\times$ Hawara Bunar 所衍生之 90 個 RILs 品系使用 GBS 技術篩選出 36661 個 SNPs，並歸納成 873 個 BIN marker，建構出全長為 1980 cM 且平均間隔 2.27 cM 的連鎖圖譜。綜上所

述，提高連鎖圖譜分子標誌密度能夠貢獻更多有效的遺傳訊息，則有利於 QTL 定位的準確度，未來若進一步精細定位本研究之水稻苗期耐寒性 QTL，可將提高族群的大小以及分子標誌密度作為首要任務，且可考量使用不同類型的分子標誌系統，以彌補 SSR 分子標誌在水稻各染色體分布之不均勻。



二、親本的苗期耐寒性

本研究使用的外表型評估材料為 $Mi \times TN16$ 雜交後代 $F_{2:3}$ 世代族群，兩親本皆為梗稻品種。 Mi 係於 1972 年以 γ 射線誘變方法育成，具心白及優良的耐寒特性，為日本近年產量第三高的酒米品種，其在 2021 年產量為 5710 t，主要種植於長野縣至秋田縣一帶，約北緯 36 °N -39 °N 範圍 (日本農林水產省，2021)。 $TN16$ 由日本近年產量最高且栽培面積最廣的食用米品種越光 (コシヒカリ) 及臺灣臺農 67 號以回交方法於 2012 年育成，其具有 95%越光及 5%臺農 67 號的遺傳背景(陳等人，2019)。越光在日本主要種植於富山縣至新潟縣一帶，約為北緯 36 °N -38 °N 範圍 (日本農林水產省，2021)。 Mi 實際於日本栽植範圍較越光涵蓋更北部且海拔亦較高之區域，且細究兩品種栽培區域插秧時期氣溫， Mi 在秋田縣插秧期為 5 月上旬左右，近五年溫度約在 10°C至 15°C，平均約 12°C；越光在新潟縣插秧期為 5 月中旬至 6 月上旬，近五年溫度約在 12°C至 21°C，平均約 17°C (Weather Spark, 2022)。越光為日本產量最高梗稻品種，本身具一定耐寒性 (下野裕之，2018)，但在臺灣栽培環境仍出現寒害。 Mi 較越光有更佳的苗期耐寒性，其栽培區域在苗期的溫度低於越光品種，而 $TN16$ 的另一親本臺農 67 號之耐寒性則是中感 (陳等人，2004)。本研究由上述品種背景資料推測 Mi 較 $TN16$ 可能具更佳的耐寒性，並在預備試驗證實 Mi 較 $TN16$ 更為耐寒，且有明顯耐寒性外表型差異，因此選擇此梗稻雜交後代族群作為苗期耐寒性之 QTL 定位材料。

$TN16$ 具備 95%越光的遺傳背景，有一定程度的耐寒性，因此本研究在決定能有效評估兩親本苗期耐寒性的低溫處理條件時經過多次嘗試。分別嘗試過 4°C處理 3、5、7 及 9 天，並皆恢復 7 天後觀察，發現若僅低溫處理 3 天及 5 天者，則兩親本外表型均顯現耐寒外表型，且無明顯差異；低溫處理 7 天及 9 天者，則兩親本苗期耐寒性有明顯的差異，不過 7 天與 9 天兩結果未有明顯差異，因此最後選擇 4°C處理 7 天作為本研究低溫處理條件。

除此之外，在兩親本外表型調查時也發現，兩親本之根長亦具有明顯的差異，推測可能與褪黑激素表現量有關，因褪黑激素表現增加會促進水稻幼苗根長 (Park and Back, 2012)，也會增加苗期植株的耐寒性 (Byeon et al., 2013; Kang et al., 2010)，但仍有待進一步的驗證。

三、 外表型調查

在苗期耐寒性之外表型調查過程中，遭遇了發芽率欠佳、單次處理數目受限及溫室環境不穩定等困難。其可能成因及對結果之可能影響以下分述：

首先，本研究使用材料為 2019 年第一期作由雜交族群 F_2 世代單株自交產生的 $F_{2:3}$ 品系種子，材料在該年 6 月中旬收穫與乾燥後，部分品系因其他研究為調查心白性狀而脫殼至糙米狀態，其餘部分維持稻穀狀態，各株 $F_{2:3}$ 種子分裝儲存於 4°C 冰箱。本研究外表型評估於 2021 年 8-10 月，種子儲藏時間已超過 2 年，在催芽過程中發現以糙米狀態儲存的品系發芽率普遍偏低，甚至有部分品系之發芽率為 0%；而以稻穀狀態儲存的品系發芽率則較佳。其可能成因分別從儲藏條件的倉儲溫度、包裝形式、稻穀含水量、相對溼度及儲藏狀態等五面向進行討論，由於保存種子於 4°C 遠低於稻穀安全儲藏溫度的 15°C，應能有效減緩稻穀呼吸作用與抑制微生物孳生，在試驗過程中也未發現黴菌感染問題；在包裝形式上，單株種子被分別收置於紙製信封中，整批材料被收納於封口夾鏈袋中，夾鏈袋雖大致可隔絕外部空氣，但並非達真空而仍有氣體交換的可能，但紙製信封則會吸溼，而可能不利於種子儲藏；在稻穀含水量及相對溼度方面，種子雖在儲存前經乾燥處理，但 4°C 冰箱其溼度無法控制，冰箱內其他儲存物品及每次開闔都有影響其相對溼度的可能，稻穀與糙米又具吸溼性，有造成含水率上升不耐儲藏的可能；最後就儲藏狀態而言，種子品質下降主要來自米糠及胚芽的變化，脂肪酸度增加為品質劣變的指標，糙米狀態由於糠層及胚芽的脂肪成分未去除，在相同儲藏條件下屬於最不耐儲藏的狀態，而稻穀狀態雖保留糠層及胚芽，但有外殼包覆能降低含水率及氧化速度，故較糙米更耐儲藏，與侯雅玲 (2018) 對發芽率的觀察一致。在本研究中，發芽株數低於 5 株的品系均被排除，最後

納入分析的 104 個品系皆為有 5 株以上發芽且皆成長至三葉齡者。發芽率低造成部分品系被排除，雖不致會影響苗期耐寒性 QTL 定位結果，但可能降低其精確度，且若苗期耐寒性與儲藏性兩性狀間有關聯，便有流失潛在較小效應之 QTL 的可能；而同一品系內較少的株數亦可能造成取樣誤差，影響外表型評估的結果。

再者，由於低溫處理所使用的 4°C 冰箱之體積一次亦只能容納一個塑膠盆。而塑膠盆能夠容納的樣本數為 24，扣除參照用的兩親本與台中秈 10 號，每次試驗至多只能處理 21 個品系。除此之外，因分批處理材料而拉長了整體外表型評估的時間跨度，低溫處理試驗共持續了約 2.5 個月，以致於低溫處理後每批材料可能處在不同的溫室環境下恢復。

此外，本研究在外表型評估過程中遭遇的另一個困難即是溫室天氣的不穩定。試驗過程中於「生長至三葉齡」以及「低溫處理後恢復期」此兩個生育階段會將試驗材料栽培於溫室內，但因溫室未有人為調控溫、溼度及光照，因此每批處理材料會因移入溫室時間的不同而有不同的氣候條件。由發芽生長至三葉齡此段時期僅是試驗材料的預備，其時間長短不致影響研究結果，不過低溫處理後恢復期則因牽涉到評估的時間點，會影響研究方法與結果。本研究試驗共分成 9 批材料，第 1 批材料於 2021/9/17 進入低溫處理後恢復期，最後一批材料於 2021/12/01 結束低溫處理後恢復期，橫跨約 2.5 個月。以中央氣象局臺北觀測站天氣觀測資料(表十二)檢視各批材料於低溫處理後在恢復期間的天氣狀況，均溫最高的處理批次是第 1 批材料的

29.79°C，最低的是第 8 批材料的 20.07°C；平均日高溫最高的批次是第 1 批材料的 34.29°C，最低的是第 8 批材料的 22.11°C；平均日低溫最高的批次是第 2 批材料的 26.83°C，最低的是第 8 批材料的 17.97°C (交通部中央氣象局，2021)。可知在試驗過程中氣溫由高轉低且變動幅度大，就均溫而言，從第 4 批材料便開始低於水稻栽培最適溫度的 25-30°C，雖說均溫皆維持在 20°C 以上，對於此稈稻雜交族群不至有所危害，但可能降低其在恢復期的生長速度，並牽涉到低溫處理後性狀表現的速度。

除了氣溫以外，日照也會影響植株生長速度，由表十二，平均日照時數在第 1 及第 2 批材料明顯較高，分別為 7.86 及 8.8 小時，後 7 批材料則皆低於 3.21 小時，最低

者為第 4 批材料的 0.29 小時；而平均日照率在第 1 及第 2 批材料明顯較高，分別為 65.25% 為 75.04%，後 7 批材料則皆低於 29.6%，最低者為第 4 批材料，僅有 2.56%。不論是平均日照時數或平均日照率，在每批材料間有極大落差，且可以發現在第 2 批材料以後此二觀測值都明顯下降，而降低恢復期的生長速度，並影響到低溫處理後性狀表現的速度。

在本研究試驗過程中，第 1、2、3 及第 5 批材料苗期耐寒性外表型差異皆在恢復 7 天後顯現，可順利進行外表型評估；第 4 批材料在恢復 7 天後發現兩親本外表型雖可辨別，但葉片黃化程度較前 3 批材料不明顯，推測可能與氣溫相關，雖也在恢復 7 天時行外表型評估，但有將材料持續種植，發現性狀會隨著種植時間延長，而更加容易辨別。因此在第 6、7、9 批材料發覺恢復 7 天後兩親本外表型難區分時，延長其恢復期至 9 天，兩親本外表型差異表現明顯時才進行外表型評估，第 8 批材料更延長恢復期至 14 天外表面型差異明顯才評估。

綜上所述，本研究以調整恢復期天數的方式因應溫室內氣溫及日照之變異，完成有效的外表型調查。未來進行低溫處理試驗時，應考量當時期天氣狀況，以調整恢復期天數以利外表型調查，或使用溫、溼度可控之溫室、生長箱以觀察低溫處理後的恢復，可降低試驗過程中的環境變數。



表十二、各批材料低溫處理後恢復期天數及天氣情形

Table 12. Days of recovery after low temperature treatment and weather in the duration of each batch of treatment

Batch number	Average temperature (°C)	Average daily maximum temperature (°C)	Average daily minimum temperature (°C)	Average sunshine hours (hour)	Average insolation (%)	Average cloudage (0~10)	Recovery period (day)
1	29.79	34.29	26.78	7.86	65.25	5.09	7
2	29.26	32.99	26.83	8.80	75.04	3.69	7
3	25.86	28.39	23.67	2.63	23.01	8.16	7
4	21.64	23.13	20.23	0.29	2.56	9.23	7
5	23.00	25.16	21.69	1.47	13.23	8.83	7
6	20.64	23.24	18.23	3.21	29.60	7.03	9
7	20.50	22.74	18.24	1.14	10.63	8.87	9
8	20.07	22.11	17.97	1.19	11.13	8.71	14
9	20.29	22.43	18.11	1.16	10.88	8.79	9



四、 外表型的比例分布與遺傳模式

本研究共定位到 $qLTT-2$ 、 $qLTT-5$ 、 $qLTT-6$ 及 $qLTT-7$ 四個苗期耐寒性相關的 QTL，其中 $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 具有較大的效應，不過 $qLTT-2$ 及 $qLTT-7$ 的 LOD 值亦超過閾值，在試驗族群中對耐寒性有一定影響，可能因為同時定位到效應較大的 $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 而導致其效應相對較小，倘若在其他試驗族群或低溫處理條件下， $qLTT-2$ 及 $qLTT-7$ 對耐寒性可能有較大的效應。例如 Han et al. (2004) 於 $qLTT-2$ 位置偵測得之 QTL 為該研究中效應最大者；Yang et al. (2018) 於 $qLTT-7$ 位置偵測得之 QTL 為該研究中效應最大者，因此 $qLTT-2$ 及 $qLTT-7$ 仍具有其在水稻苗期耐寒性選拔上的價值。根據圖八推論， $qLTT-2$ 及 $qLTT-7$ 屬隱性遺傳模式，即僅於 Mi 同結合基因型（以 MM 表示）時顯現耐寒的外表型，若在 TN16 同結合基因型（以 TT 表示）及異結合基因型（以 MT 表示）時顯現不耐寒的外表型； $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 則屬加性遺傳模式，於 MM 基因型時最為耐寒，在 MT 基因型時稍微耐寒，於 TT 基因型時顯現不耐寒的外表型。 $F_{2:3}$ 世代依上述遺傳模式，在 $qLTT-2$ 及 $qLTT-7$ 期「耐寒」與「不耐寒」分離比（MM：TT 及 MT）為 3:5； $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 期「耐寒」、「稍微耐寒」與「不耐寒」分離比（MM：MT：TT）為 3:2:3。四個 QTL 共有 36 種基因組合，參考本研究估計的加性效應與顯性效應，將其劃分為「耐寒」（至少兩個 QTL 為 MM 基因型且 $qLTT-5$ 及 $qLTT-6$ 並非 TT 基因型）、「不耐寒」（至多於 $qLTT-2$ 或 $qLTT-7$ 其一為 MM 基因型，其他皆為 TT 或 MT 基因型）以及「中間型」（其餘部分）三者，而「耐寒」：「中間型」：「不耐寒」外表型的理論分布為 31.54 : 37.55 : 34.91。

本研究之目測評估法將水稻苗期耐寒性分成 1-5 五個等級（表三），共評估了 104 個 $F_{2:3}$ 世代品系，未發現超越親本分離之品系。依耐寒等級 2-5 之比例分布為 27 : 37 : 9 : 31，將兩中間型合併則為 27 : 46 : 31，與前述遺傳模式的外表型理論分布 31.54 : 37.55 : 34.91 以卡方適合度檢定後顯示兩者無顯著差異，支持本研究對四個 QTL 所提出之遺傳模式。綜上所述本研究定位到四個水稻苗期耐寒性相關 QTL，並證實效



應較大之 QTL *qLTT-2* 及 *qLTT-7* 屬隱性遺傳模式，效應較小之 QTL *qLTT-5* 及 *qLTT-6* 屬加性遺傳模式，有利此四個 QTL 未來於水稻苗期耐寒性選拔上的應用。

五、水稻苗期耐寒性之 QTL 定位

本研究進行之 QTL mapping 以 Mi × TN16 雜交後代族群為材料，其中以 F_2 世代分析分子標誌之基因型，並調查其所衍生之 $F_{2:3}$ 品系的耐寒性狀。由於水稻為自交作物， F_2 與 $F_{2:3}$ 世代間同結合基因型個體會維持相同基因型，兩世代僅在 MT 基因型可能產生差異。 F_2 世代異結合基因型位點據遺傳理論於 $F_{2:3}$ 世代有 1/4 會是 MM 基因型；1/4 會是 TT 基因型；1/2 維持 MT 基因型，故本研究 MT 基因型資料理論上有 50% 與實際基因型有差異。此情形對 QTL mapping 的結果之影響有二，首先因為標記為 MT 位點包含 MM 及 TT 基因型，會降低 QTL 偵測的準確性，有流失效應較小的 QTL 的可能，不過並不影響已偵測得之 QTL。再者，此情形會影響 MT 基因型其外表型平均值的計算，進而可能影響顯性效應的估計。不過水稻為自交作物，除雜交稻外，一般栽培品種最終皆會固定為同結合基因型之純系品種，因育種上以加性效應為主要考量，故並不影響本研究對臺灣梗稻耐寒性育種的參考價值，前人研究中也 不乏使用此方法完成有效 QTL mapping 的結果 (Jahan et al., 2021; Liu et al., 2018; Solis et al., 2017)。

(一) *qLTT-2*

本研究共定位到 4 個水稻苗期耐寒性相關的 QTL，其中 *qLTT-2* 位於水稻第 2 對染色體，在連鎖圖譜 82 cM 位置，介在 RM6375、RM13076 兩分子標誌之間，約為物理圖譜 9.55 - 12.68 Mb 處；就其區間估計，則是物理圖譜 6.74 - 19.18 Mb 之間隔，與前人多篇研究結果有所重疊（表十三）。*qLTT-2* 其 LOD 值為 2.65，在本研究定位到的四個 QTL 中排名第三，效應較小。Yang et al. (2013b)、Kim et al. (2014)、Wang et al. (2016) 三篇研究於此 *qLTT-2* 位置所定位之 QTL 其耐寒基因型均來自梗稻品種，與本研究結果相同。Han et al. (2004) 於此處定位之 QTL 為該研究中 LOD 值最高的顯著



QTL，與本研究相較，在父母本、植株葉齡期與低溫處理條件皆有所差異，推測可能在該試驗族群、較高的低溫條件(17°C)或於分蘗期，此 QTL 對於耐寒性會有較大的貢獻，因而在該定位結果中 LOD 值最高。而 Yang et al. (2018)與本研究同樣以兩粳稻品種雜交族群為材料，但其以目測、葉片導電度及根長為耐寒性指標，僅定位到 1 個 QTL 位於此 *qLTT-2* 位置，與本研究同樣顯示出粳稻品種間耐寒表現的差異。該研究雖採用與本研究不同的外表型鑑定方法，但同樣使用兩粳稻雜交族群定位到相同位置，除了表示耐寒性評估使用不同生理指標的可行性，也顯示出 *qLTT-2* 在苗期耐寒性表現的穩定。

由於在 *qLTT-2* 範圍內已知的水稻苗期耐寒性相關基因序列分析中並未發現兩親本間的序列差異，因此推測此 QTL 貢獻的耐寒性可能與其他基因相關。故本研究根據 NCBI database 進一步探討 *qLTT-2* 區間內其他可能貢獻耐寒性之基因。在與 *qLTT-2* 相鄰的兩分子標誌 RM6375 與 RM13076 之間，即物理圖譜約 9.55 - 12.68 Mb 區間內共有 233 個轉錄體。除了缺乏轉錄證據的 75 個轉錄體外，其餘 158 個轉錄體皆依據其功能檢視該轉錄體與植物耐寒性是否相關（附表一）。結果顯示，158 個轉錄體中有 63 個尚未發現其功能與植物低溫反應相關的文獻，因此推測這些轉錄體與耐寒性相關性較低。而其餘 95 個其功能與植物低溫反應相關的轉錄體中，有 14 個與轉錄過程相關 (Capovilla et al., 2015; Luo et al., 2021; Qian et al., 2021; Wang et al., 2003; Wang et al., 2021b; Yang et al., 2012)，13 個與植物防禦反應相關 (Cao et al., 2005; Kim et al., 2017; Xiong and Yang, 2003; Yokotani et al., 2013b)，有 11 個與 ABA 訊號傳導相關 (Qin et al., 2019; Sebastián et al., 2020; Venkatesh et al., 2020; Yan et al., 2011; Zhang et al., 2008)，14 個與逆境反應相關，5 個與低溫反應相關 (Gu et al., 2008; He et al., 2019; Kong et al., 2015; SmoleńAska-Sym and Kacperska, 1994)，10 個與細胞構造相關 (Dametto et al., 2015; Oliveira et al., 1990; Guo et al., 2002; Zhao et al., 2020)，5 個與脂質、胺基酸及蛋白質代謝相關 (Lv et al., 2021; Mao et al., 2009; Wang et al., 2018a)，13 個與滲透調節相關(Cao et al., 2017; Chen et al., 2018; Modareszadeh et al., 2021; Wang et al., 2018b)，5 個與生長分化相關 (Ahlfors et al., 2004; Koiwa et al., 2003;

Meng et al., 2020), 3 個與 Zinc finger 相關 (Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Liu et al., 2007), 2 個與葉綠體相關 (Koehler et al., 2012)。上述轉錄體位於 *qLTT-2* 區間內且與植物低溫反應或滲透逆境反應相關，是 *qLTT-2* 潛在的候選基因。

而在上述轉錄體中有部分其功能已被證實與水稻耐寒表現相關，分述如下：有 2 個轉譯 BURP domain-containing protein 的轉錄體 *LOC4329048* 及 *LOC4329050*，在水稻耐寒基因 *SNAC2* 研究中表現量受到低溫誘導，可能與水稻耐寒性相關(Hu et al., 2008)。而轉錄體 *LOC107275860* 與已知的水稻耐寒基因 *OsCAF1B* 皆為 CCR4-NOT 轉錄因子，因此可能與耐寒性相關(Fang et al., 2021)。轉錄體 *LOC4329010* 與水稻耐寒基因 *OsLRR2* 的 leucine-rich repeat receptor-like protein 相關，可能影響水稻耐寒性(Liao et al., 2017)。而轉錄體 *LOC107276173* 及 *LOC107276277* 所轉譯的 calcineurin B-like protein 被證實與水稻滲透逆境相關 (Gu et al., 2008)。這些轉錄體已有水稻的耐寒相關研究佐證，是較有可能的候選基因。

(二) *qLTT-5*

qLTT-5 位於水稻第 5 對染色體，連鎖圖譜 25 cM 位置，介在 RM17764 與 RM18068 兩分子標誌之間，約為物理圖譜 0.58 – 6.13 Mb 處；就其區間估計，則為物理圖譜 0.18 - 12.78 Mb 之間隔，其位置與前人多篇水稻耐寒性 QTL mapping 結果重疊（表十三）。*qLTT-5* 其 LOD 值為 3.09，在定位到的四個 QTL 中排名第二，屬於效應較顯著的兩 QTL 之一。但是 Jiang et al. (2008) 於此處定位之 QTL 為該研究中效應最小者，推測是由於其試驗材料為籼粳雜交族群，於第 1 對染色體上 7.48 - 10.49 Mb 已定位到一效應極大的 QTL，使得此 *qLTT-5* 位置在分析結果中顯示效應較小。而本研究中 Mi 及 TN16 為兩粳稻品種，可能於第 1 對染色體上該 QTL 位置無差異，因此 *qLTT-5* 其耐寒性效應在本研究中較顯著。Zhang et al. (2018) 分析籼稻栽培種萌芽期耐寒性，也在 *qLTT-5* 位置偵測得 QTL，顯示出此位置與籼稻品種間、粳稻品種間及粳稻品種間耐寒性皆相關，除體現其穩定性外，亦可能不同等位基因間具有多樣化的序列差異，而造成耐寒表現的差異。Wang et al. (2016) 使用 GWAS 於此處定位之

QTL 其耐寒基因型與本研究同樣來自梗稻品種。Jiang et al. (2006) 於此 *qLTT-5* 位置所定位之 QTL 為該研究中效應最大者，耐寒基因型與本研究相同來自梗稻品種，且該研究以水稻萌芽期耐寒性為探討目標，因此 *qLTT-5* 可能在水稻萌芽期及苗期的耐寒性都有所貢獻，可應用於直播稻的耐寒性改良上。

由於在 *qLTT-5* 位置已知的水稻苗期耐寒性相關基因序列分析中並未發現兩親本間的序列差異，因此推測此 QTL 貢獻的耐寒性可能與其他基因相關。故本研究根據 NCBI database 進一步探討 *qLTT-5* 區間內其他可能貢獻耐寒性之基因。在與 *qLTT-5* 相鄰的兩分子標誌 RM17764 與 RM18068 之間，即物理圖譜約 0.58 – 6.13 Mb 區間內共有 549 個轉錄體。除了缺乏轉錄證據的 167 個轉錄體外，其餘 382 個轉錄體皆依據其功能進行檢視是否與植物耐寒性相關（附表一）。結果顯示，382 個轉錄體中有 196 個轉錄體尚未發現其功能與植物低溫反應相關的文獻，推測此些轉錄體與耐寒性相關性較低。而其餘 186 個其功能與植物低溫反應相關的轉錄體中，有 47 個與轉錄過程相關 (Choder and Young, 1993; Mao et al., 2009; Qin et al., 2015; Wang et al., 2003; Yang et al., 2012; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2021)，19 個與滲透運輸相關 (Chen et al., 2018; Gothandam et al., 2009; Hu et al., 2019; Sun et al., 2013)，15 個與 ABA 訊號調節相關 (Li et al., 2017b; Lim and Lee, 2014; Venkatesh et al., 2020; Yan et al., 2011)，16 個與低溫誘導訊號相關 (Gao et al., 2017; Luo et al., 2021; Muñoz-Amatriaín et al., 2020; Stanca et al., 1996)，14 個與泛素相關 (Kurepa et al., 2003)，10 個與氧化還原相關 (Llorente et al., 2002; Niu et al., 2021)，9 個與 Zinc Finger 相關 (Huang et al., 2012; Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Liu et al., 2007)，9 個與蛋白質磷酸化相關，8 個與逆境反應相關 (Cao et al., 2019; Das et al., 2019; Melencion et al., 2017)，7 個與脂肪酸代謝相關 (Pinhero et al., 1998; Sui et al., 2007; Zhang et al., 2018a)，6 個與乙烯訊號調節相關 (Catalá et al., 2014; Licausi et al., 2013)，5 個與生長分化相關 (Lv et al., 2021; Meng et al., 2020)，5 個與葉綠體相關 (Begara-Morales et al., 2019; Lin et al., 2020; Yu et al., 2021)，3 個與水楊酸訊號調節相關 (Kim et al., 2017)，2 個與吉貝素訊號調節相關 (Thomas et al., 1999)，2 個與 DNA 甲基化相關

(Pan et al., 2011)，2 個與防禦反應相關 (Wang et al., 2019; Xiong and Yang, 2003)，2 個與粒線體相關 (Luo et al., 2021)，2 個與細胞構造相關 (Gothandam et al., 2009)，1 個與春化反應相關 (Bond et al., 2011)，1 個與細胞代謝相關 (Wang et al., 2021a)，1 個與鈣離子訊號調節相關 (Jing et al., 2016)，1 個與糖解過程相關 (Lugassi et al., 2019)，1 個與儲存蛋白相關 (Goulas et al., 2007)。這些轉錄體位於 *qLTT-5* 區間內且與植物低溫反應或滲透逆境反應相關，因此推測對於水稻苗期耐寒性可能有影響，是 *qLTT-5* 潛在的候選基因。

而在上述轉錄體中有部分其功能已被證實與水稻耐寒表現相關，分述如下：

LOC107277971 與已知水稻耐寒基因 *OsPRP3* 同樣轉譯出 proline-rich protein，可能與水稻耐寒性相關 (Gothandam et al., 2009)。*LOC4337852* 所轉錄的 GATA 轉錄因子有抑制 WRKY 家族轉錄因子進而影響水稻耐寒性的可能 (Zhang et al., 2021)。

LOC4337815 轉錄體的 *SRC2* 基因表現量與水稻耐寒性呈負相關 (Rativa et al., 2020)。*LOC4337718*、*LOC9271771*、*LOC4337756* 及 *LOC4338039* 為 MYB 家族轉錄因子，與水稻耐寒性調控可能有關 (Su et al., 2010; Yang et al., 2012)。

上述轉錄體功能已有水稻耐寒性相關的研究佐證，推測其造成兩親本耐寒程度差異的可能性較大；又 *qLTT-5* 為本研究中效應較大的 QTL，因此本研究依據上述轉錄體於 NCBI database 中物理圖譜位置及其序列，針對外顯子序列設計 PCR 引子 (表十四、圖十)，並將擴增片段進行定序，以偵測兩親本序列間是否具有差異。而定序結果顯示，兩親本間於擴增片段之序列 (總長度 13777 bp) 並無差異，推測兩親本耐寒性差異可能存在於外顯子序列以外，或是在其他基因。本研究雖未偵測得兩親本間序列差異，但此結果可供未來精細定位時篩選候選基因的參考，且此些轉錄體功能皆與水稻耐寒性相關，所設計之引子亦可供未來水稻耐寒研究之參考。

(三) *qLTT-6*

qLTT-6 位於水稻第 6 對染色體，在連鎖圖譜 206 cM 位置，介在 CH0629 與 P17G10-24 兩分子標誌之間，約為物理圖譜 28.30 – 30.97 Mb 處；就其區間估計而言，則是

物理圖譜 26.55 – 30.97 Mb 之間隔，與多篇前人研究結果重疊（表十三）。*qLTT-6* 其 LOD 值為 3.36，在定位到的四個 QTL 中排名第一，效應最大。Liu et al. (2013) 於此 *qLTT-6* 位置所定位之 QTL 其 LOD 值僅有 2.0，為該研究中效應最小者，推測是因為該研究以秈稈雜交族群為試驗材料，由於同時定位到 7 個 QTL 且於第 2 對染色體定位到效應大者，因此在定位分析時稀釋了該 QTL 之效應。Zhang et al. (2014b) 於此 *qLTT-6* 位置所定位之 QTL 其 LOD 值為 3.1，亦為該研究中效應最小者，推測是因為使用秈稈雜交族群為材料，於第 9 及第 12 對染色體偵測得兩效應極大的 QTL，因此在定位分析時稀釋了該 QTL 之效應。由本研究結果推測，*qLTT-6* 可能於兩梗稻品種雜交族群其耐寒性效應可能較明顯。

由於在 *qLTT-6* 位置已知的水稻苗期耐寒性相關基因序列分析中並未發現兩親本的序列差異，因此推測此 QTL 貢獻的耐寒性可能與其他基因相關。故本研究根據 NCBI database 進一步探討 *qLTT-6* 區間內其他可能貢獻耐寒性之基因。在與 *qLTT-6* 相鄰的兩分子標誌 CH0629 與 P17G10-24 之間，即物理圖譜約 28.30 – 30.97 Mb 區間內共有 352 個轉錄體。除了由於缺乏轉錄證據的 113 個轉錄體外，其餘 239 個轉錄體皆依據其功能檢視該轉錄體與植物耐寒性是否相關（附表一）。結果顯示，239 個轉錄體中有 119 個尚未發現其功能與植物低溫反應相關的文獻，因此推測這些轉錄體與耐寒性相關性較低。其餘 120 個其功能與植物低溫反應相關的轉錄體中，有 16 個與 ABA 訊號調節相關 (Aarati et al., 2003; Byeon et al., 2013; Chen et al., 2015; Venkatesh et al., 2020; Yan et al., 2011; Zhao et al., 2014)，15 個與轉錄過程相關 (Chen et al., 2019; Kang et al., 2016; Qian et al., 2021; Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2009)，10 個與防禦反應相關 (Cao et al., 2019; Cao et al., 2005; Xiong and Yang, 2003; Yokotani et al., 2013)，10 個與細胞構造相關 (Beine-Golovchuk et al., 2018; Dametto et al., 2015; Takahashi et al., 2021)，9 個與低溫誘導訊號相關 (Luo et al., 2021)，7 個與氧化還原相關 (Llorente et al., 2002; Prasad, 1997)，7 個與滲透運輸相關 (Mao et al., 2009)，5 個與泛素相關 (Wang et al., 2019; Xu and Xue, 2019; Yan et al., 2003)，5 個與逆境反應相關 (Jung et al., 2013; Song et al., 2016; Vashisht and Tuteja, 2006)，3 個與脂肪酸代謝

相關 (Sui et al., 2007; Zhang et al., 2018a), 5 個與鈣離子訊號調節相關 (Saijo et al., 2000; Yamazaki et al., 2008), 5 個與糖解作用相關 (Li et al., 2017a; Lugassi et al., 2019), 4 個與 Zinc Finger 相關 (Huang et al., 2012; Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Liu et al., 2007), 5 個與生長分化相關 (Lv et al., 2021; Shou et al., 2004), 4 個與葉綠體相關 (Lin et al., 2020; Shirasawa et al., 2006), 2 個與 IAA 訊號調節相關 (Chen et al., 2014; Li et al., 2015), 2 個與光合作用相關 (Tang et al., 2013), 2 個與細胞代謝相關 (Wang et al., 2012), 2 個與蛋白質磷酸化相關 (Hu et al., 2010), 1 個與 JA 訊號調節相關 (Zheng et al., 2018), 1 個與乙烯訊號調節相關 (Zhang et al., 2016)。

其中 *LOC9272377* 轉譯出的 choline monooxygenase 在水稻中過度表現會影響甜菜鹼的含量，進而影響其耐寒性 (Shirasawa et al., 2006)。轉錄體 *LOC4342078* 與已知的水稻耐寒基因 *OsZIP23* 與 *OsZIP52* 同屬 bZIP 轉錄因子家族，對於水稻耐寒性可能有所影響 (Liu et al., 2012; Xiang et al., 2008)。而轉錄體 *LOC4342059* 之功能與水稻耐寒基因 *OsCDPK* 相關，牽涉到鈣離子的滲透調節，與耐寒反應可能有關 (Saijo et al., 2000)。*LOC4341953* 則是轉錄出 GATA 轉錄因子，可因抑制 WRKY 家族轉錄因子，而影響水稻耐寒性 (Zhang et al., 2021)。上述轉錄體位於 *qLTT-6* 區間內，且與植物低溫反應或滲透逆境反應相關，因此推測對於水稻苗期耐寒性可能有影響，是 *qLTT-6* 潛在的候選基因。

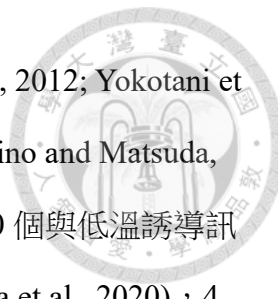
上述轉錄體功能已有水稻耐寒性相關的研究佐證，推測其造成兩親本耐寒程度差異的可能性較大；又 *qLTT-6* 為本研究中介效較大的 QTL，因此本研究依據上述轉錄體於 NCBI database 中物理圖譜位置及其序列，針對外顯子序列設計 PCR 引子 (表十四、圖十)，並將擴增片段進行定序，以偵測兩親本序列間是否具有差異。而定序結果顯示，兩親本於擴增片段之序列 (總長度 11924 bp) 並無差異，推測兩親本耐寒性差異可能存在於外顯子序列以外，或是在其他基因。本研究雖未偵測得兩親本間序列差異，但此結果可供未來精細定位時篩選候選基因的參考，且此些轉錄體功能皆與水稻耐寒性相關，設計之引子亦可供未來水稻耐寒研究之參考。



(四) *qLTT-7*

qLTT-7 位於水稻第 7 對染色體，連鎖圖譜 169 cM 位置，介在 RM1364 與 RM1306 兩分子標誌之間，約為物理圖譜 26.77 – 28.95 Mb 處；就其區間估計而言，則是物理圖譜 22.55 – 28.95 Mb 之間隔，與多篇前人研究重疊（表十三）。*qLTT-7* 其 LOD 值為 2.63，在定位到的四個 QTL 中排名最後，屬效應最小者。Zhang et al. (2014b) 及 Wang et al. (2016) 兩研究於此 *qLTT-7* 位置所定位之 QTL 其耐寒基因型與本研究同樣來自粳稻品種。Han et al. (2004) 於此處定位之 QTL 在該研究定位到的 5 個 QTL 中排名第 3，且低溫敏感基因型來自秈稻品種，推測 *qLTT-7* 於秈稻及粳稻族群皆存在，且因品種間遺傳差異而貢獻不一的苗期耐寒性。Yang et al. (2018) 與本研究同以兩粳稻品種雜交族群為材料，該研究以葉片電導度、根長及根重作為耐寒性指標，定位到 1 個 QTL 位於此 *qLTT-7* 位置，與本研究同樣顯示出粳稻品種間耐寒性具有差異，但該 QTL 為該研究定位結果中效應最大者，推測可能因為粳稻品種或低溫處理條件的不同，而造成此位置 QTL 於該研究效應較大，但在本研究則效應較小。使用葉片電導度的定位結果共定位到兩個 QTL 分別落在本研究之 *qLTT-2* 及 *qLTT-7* 位置，與本研究雖使用不同的外表型評估方法，但同樣在兩粳稻雜交族群定位到相同位置，可見耐寒性評估使用不同生理指標具可行性，也顯示 *qLTT-2* 及 *qLTT-7* 兩 QTL 在苗期耐寒性表現的穩定。

由於在 *qLTT-7* 位置已知的水稻苗期耐寒性相關基因序列分析中並未發現兩親本間的序列差異，因此推測此 QTL 貢獻的耐寒性可能與其他基因相關。故本研究根據 NCBI database 進一步探討 *qLTT-7* 區間內其他可能貢獻耐寒性之基因。在與 *qLTT-7* 相鄰的兩分子標誌 RM1364 與 RM1306 之間，即物理圖譜約 22.55 – 28.95 Mb 區間內共有 271 個轉錄體。除了由於缺乏轉錄證據的 107 個轉錄體外，其餘 164 個轉錄體皆依據其功能檢視與植物耐寒性是否相關（附表一）。結果顯示，164 個轉錄體中有 68 個查無其功能與植物低溫反應相關的文獻，因此推測這些轉錄體與耐寒性相關性較低。而其餘 96 個其功能與植物低溫反應相關的轉錄體中，有 12 個與轉錄過程相



關 (Hemsley et al., 2014; Liu et al., 2012; Xiang et al., 2008; Yang et al., 2012; Yokotani et al., 2013; Zhang et al., 2021) , 14 個與水稻發芽期低溫反應相關 (Fujino and Matsuda, 2009) , 8 個與滲透運輸相關 (Mao et al., 2009; Wang et al., 2014) , 10 個與低溫誘導訊號相關 (Dharshini et al., 2020; Kim et al., 2016; Luo et al., 2021; Rativa et al., 2020) , 4 個與糖解作用相關 (Hashempour et al., 2019; Li et al., 2017a; Lugassi et al., 2019) , 6 個與 ABA 訊號調節相關 (Pelagio-Flores et al., 2019; Venkatesh et al., 2020; Yan et al., 2011; Zhao et al., 2014) , 8 個與逆境反應相關 (Ciuzan et al., 2015; He et al., 2019; Liu et al., 2016; Vashisht and Tuteja, 2006) , 6 個與泛素相關 (Kurepa et al., 2003; Wang et al., 2019; Xu and Xue, 2019; Yan et al., 2003) , 5 個與氧化還原相關 (Che et al., 2020; Ilk et al., 2015; Llorente et al., 2002) , 4 個與鈣離子訊號調節相關 (Jing et al., 2016; Komatsu et al., 2007; Saijo et al., 2000; Yamazaki et al., 2008) , 3 個與 Zinc Finger 相關 (Huang et al., 2012; Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Liu et al., 2007) , 3 個與光合作用相關 (Pandian et al., 2020) , 2 個與蛋白質磷酸化相關 (Hu et al., 2010) , 2 個與乙烯訊號調節相關 (Zhang et al., 2016) , 2 個與生長分化相關 (Lv et al., 2021; Sasaki et al., 2008) , 2 個與葉綠體相關 (Lin et al., 2020) , 2 個與防禦反應相關 (Xiong and Yang, 2003) , 2 個與細胞代謝相關 (Wang et al., 2021a) , 1 個與細胞構造相關 (Zhou et al., 2021) 。 上述轉錄體均位於 *qLTT-7* 區間內, 且與植物低溫反應或滲透逆境反應相關, 因此推測對於水稻苗期耐寒性可能有影響, 是 *qLTT-7* 潛在的候選基因。

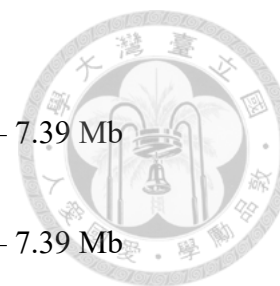
而在上述轉錄體中有部分其功能已被證實與水稻耐寒表現相關, 其中 *LOC4344296* 轉錄體為 WRKY 家族轉錄因子, 對於水稻耐寒性可能有所影響 (Yokotani et al., 2013; Zhang et al., 2021) 。 *LOC4344240* 轉錄體的 *SRC2* 基因其表現量與水稻耐寒性呈負相關 (Rativa et al., 2020) 。 轉錄體 *LOC4344086* 為 bZIP 家族轉錄因子, 與已知的水稻耐寒基因具有相似功能, 可能影響耐寒表現 (Liu et al., 2012; Xiang et al., 2008) 。 這些轉錄體已有水稻的耐寒相關研究佐證, 可列為首要考量的候選基因。



表十三、與 *qLTT-2*、*qLTT-5*、*qLTT-6* 及 *qLTT-7* 位置重疊之前人研究

Table 13. Summary of previous reports overlapped with locations of *qLTT-2*, *qLTT-5*, *qLTT-6*, and *qLTT-7*

Reference	Mapping population	Low temperature treatment	Phenotype evaluation	QTL position
<i>qLTT-2</i>				
Han et al. (2004)	Milyang 23 × Jileng 1 $F_{2:3}$ 世代 (200 個品系)	田間低溫處理(約 17°C)	目測葉色	RM324、RM29 間 (11.39 – 10.28 Mb)
Yang et al. (2013)	Nipponbare × LPBG F_3 世代 (10800 個品系)	漸進式降溫(14 至 10°C)	目測葉色	9.63 – 13.61 Mb 及 13.61 – 19.27 Mb
Kim et al. (2014)	Jinbu × BR29 RIL 族群 (123 個品系)	生長箱(日/夜溫 18/8°C) 處理 18 天	目測葉色	RM1211、RM2634 間 (18.45 – 20.50 Mb)
Wang et al. (2016)	295 個水稻栽培種	生長箱 8°C 處理 3 天恢復 7 天	目測葉色	15096404 bp 處
Yang et al. (2018)	Dongnong 422 × Kongyu 131 RIL 族群 (190 個品系)	生長箱 10°C 處理 10 天	目測葉色、葉片導電度與根長	RM13216、RM561 間 (16.91 – 19.37 Mb)
<i>qLTT-5</i>				
Jiang et al. (2008)	Asominori × IR24 RIL 族群 (71 個品系)	生長箱 6°C 處理 7 天並恢復 4 天	幼苗存活率	R569、G1458 間 (6.70 – 17.57 Mb)
Wang et al. (2016)	295 個水稻栽培種	生長箱 8°C 處理 3 天並恢復 7 天	目測葉色	1970193、6171822 及 8040996 bp



(續表十三)

Jiang et al. (2006)	N22 × USRR5 F_2 族群 (148 個品系)	15°C 低溫處理 7-15 天	發芽率	0.18 – 7.39 Mb
Zhang et al. (2018)	249 個秈稻栽培種	生長箱 5°C 處理 5 天	目測評估及存活率	0.18 – 7.39 Mb
<i>qLTT-6</i>				
Liu et al. (2013)	IL112 × GC2 $F_{2:3}$ 世代 (85 個品系)	生長箱 4-5°C 處理 9 天 後恢復 7 天	Affymetrix rice whole-genome array hybridization	RM162、RM340 間 (24.04 – 28.60 Mb)
Zhang et al. (2014)	Lijiangxintuanheigu × Sanhuangzhan-2 RIL 族群 (204 個品系)	9.1°C 冷水灌溉 9 天	目測葉色及存活率	RM30、RM400 間 (28.43 – 28.67 Mb)
<i>qLTT-7</i>				
Han et al. (2004)	Milyang 23 × Jileng 1 $F_{2:3}$ 世代 (200 個品系)	田間 17°C 處理	目測葉色	RM429、RM172 間 (26.80 – 29.56 Mb)
Zhang et al. (2014)	Lijiangxintuanheigu × Sanhuangzhan-2 (204 個品系)	生長箱 11°C 處理 7 天	目測葉色及植株存活率	RM429、RM172 間 (26.80 – 29.56 Mb)
Wang et al. (2016)	295 個水稻栽培種	生長箱 8°C 處理 3 天並 恢復 7 天	目測葉色	23783174 bp 處
Yang et al. (2018)	Dongnong 422 × Kongyu 131 RIL 族群 (190 個品系)	生長箱 10°C 處理 10 天	葉片電導度、根長及根重	RM1306、RM70 間 (28.17–28.95 Mb)

表十四、*qLTT-5* 及 *qLTT-6* 區間內水稻耐寒相關轉錄體片段擴增之引子列表Table 14. Primers used for the amplification of rice cold tolerance relating transcriptomes located in *qLTT-5* and *qLTT-6* intervals

Transcriptome	Primer	Primer (5' → 3')	G+C (%)	Tm (°C)	Transcriptome	Primer	Primer (5' → 3')	G+C (%)	Tm (°C)
(A) <i>LOC107277971</i>	1F	AGCCCGATTATTCCATCGTCC	52	60	(D) <i>LOC4337718</i>	1F	AACACACCCACAGCTACAG	55	60
	1R	CCAATTACGCTGCATTACACA	43	57		1R	GCAAGCCAAATAGGCAACACA	48	60
(B) <i>LOC4337852</i>	1F	CACTCCTACTGCTGCTGGAT	55	59		2F	GTTGCCTATTTGGCTTGCTCC	52	60
	1R	GCCGATCACCCACCTTCTGA	60	62		2R	GTGCTTTTGCCTCTGGTCC	55	60
	2F	CGCAGTGATCGTCTCTGTTCT	52	60		3F	CTTCAGTCCTTTCCAGGGACC	57	60
	2R	GAAATGTTCCACAGGGCAGC	55	60		3R	AGCCAAATGTCCTCAAGGCT	50	60
	3F	ACTAAGCCTCTGGATGAGCACT	50	61		4F	ATTAGCAGCATCCATCCGCA	50	60
	3R	GGGACCAGCTTCTTACCCTC	60	59		4R	CTGTAGCTGTGGGGTGTGTT	55	60
	4F	GAGGGTAAGAAGCTGGTCCC	60	59		5F	AGCCTTGAGGACATTTGGCT	50	60
	4R	CCCATCTGATTGGCACAAGA	50	58		5R	ACTTGAGGATGCCGGACAAG	55	60
(C) <i>LOC4337815</i>	1F	ACATTGCCACAGCAATGGAG	50	59	(E) <i>LOC9271771</i>	1F	GCGCACTGATGATGTGAGATG	52	60
	1R	TAAGGAAGGACGATGCACGC	55	60		1R	GAGGACAAGCAGACATGGACA	52	60
	2F	ACGTGAACACTTGCGAGAGAA	48	60		2F	TGCCAATTGTCCATGTCTGC	50	60
	2R	GCAATGCCCATTTGTGACACC	55	60		2R	GCACGAACCATAACCAGTTGGA	52	61
	3F	ATGGGCATTGCACTGTTTGG	50	60		3F	AACTTCTGGCGAACCACAT	50	60
	3R	GTTAAGCGATAAATTCAAGGCGA	39	58		3R	CACAGAAGGCCGGTTTTTACG	52	60
	4F	GGGAGCCCTTTCTTTGTTGG	55	60		4F	CGGTGTTGCATGATCGAAGT	50	59
	4R	TGCTGTGGCAATGTGACTGG	55	61		4R	GATCTTGCGCATGTGGGTTC	55	60

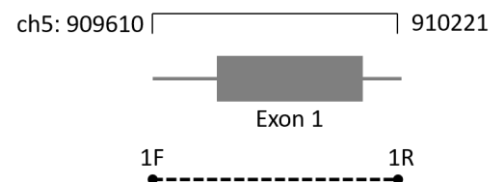
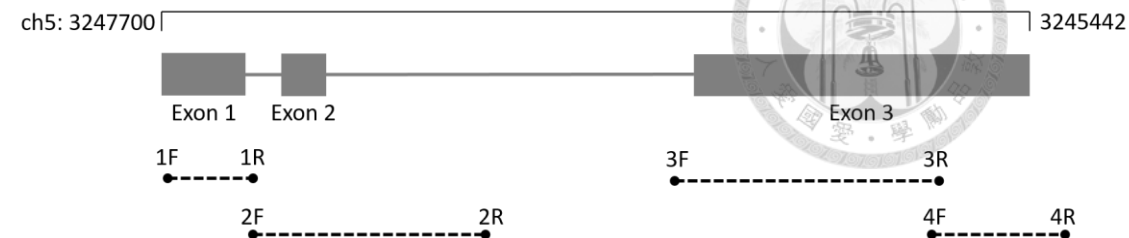
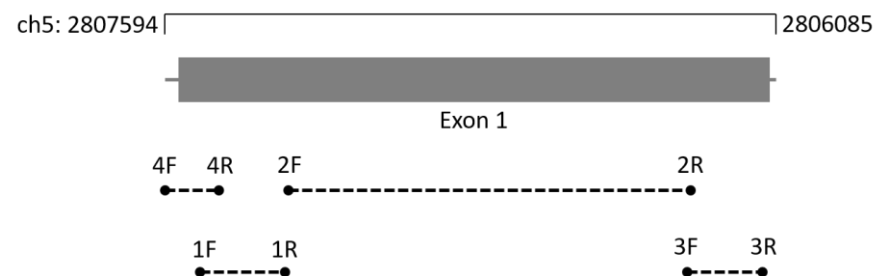
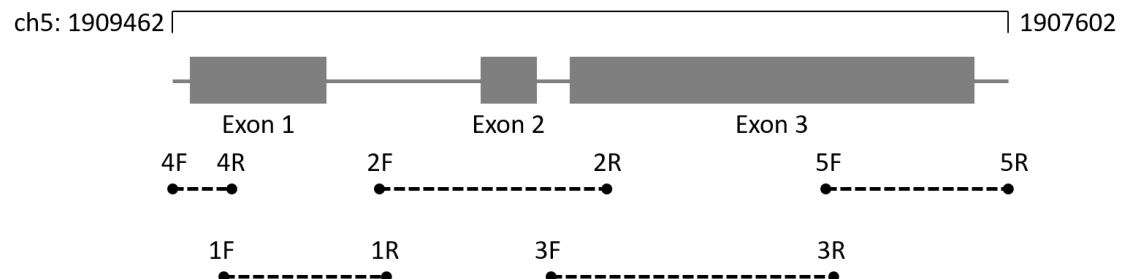
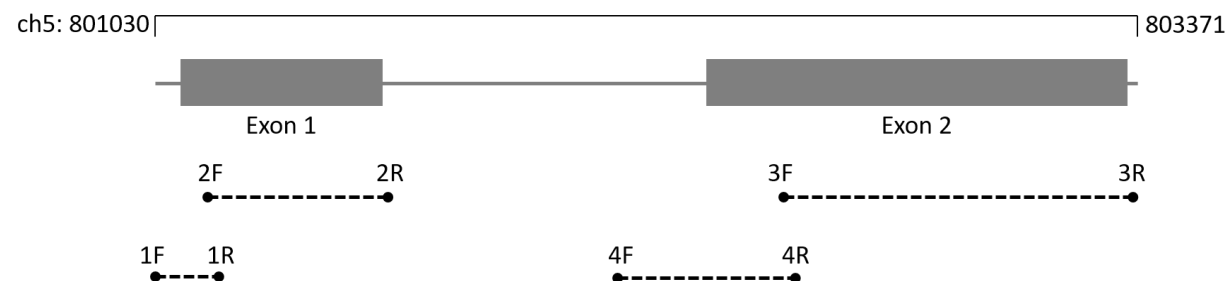
(F) <i>LOC4337756</i>	1F	ATACATACAGACACCGGCGAT	48	59
	1R	CGTGCATGTGCACCTCATTT	50	60
	2F	CTGGTGAATTGTTGCAGGGC	55	60
	2R	TCAAAGTGTTGCCTTGCAGTT	43	59
	3F	ACACCCCGTTCTACTGGGAT	55	60
	3R	AAACTGGAAAGGGAGAGGAGG	52	59
	4F	ACATCAACTAACACAGCCCTTCTA	42	60
	4R	AGGGCTGATGGTGAAACTGG	55	60
	5F	ACACCCCGTTCTACTGGGAT	55	60
	5R	AAACTGGAAAGGGAGAGGAGG	52	59
	6F	GCAGGGAAAAGGATTGGTCG	55	59
	6R	AGCATATCTTGAGTGCCCCG	55	61

(H) <i>LOC9272377</i>	1F	AATGGCTGGGTAGTGCTTCG	55	60
	1R	TACCAACCCCATATGATGGCA	48	59
	2F	TGCCATCATATGGGGTTGGTAG	50	60
	2R	GCATGGCCATCTCCACTGAT	55	60
	3F	CATCGAACAGAGCCAAACCAA	48	59
	3R	GGTTGGGAGTGTGCGAAATC	55	59
	4F	TCCACTGCCAGAACTCATGC	55	60
	4R	ACTCAGCAGATCCGAAGCAC	55	60
	5R	GTTCTGGCAGTGGAATCAGGA	52	60
	6F	TGGTTGTTTTCCAGGCCACA	50	60
	6R	GGCGACACACGTTGTGAAAA	50	60

(G) <i>LOC4338039</i>	1F	ACATCTTGTGGCTTACCAAGAA	41	58
	1R	CCGTTTGGGAATGGGTGAGA	55	60
	2F	TGCTTGAGGGCACAGCAATA	50	60
	2R	CACAAGCTGATGTTTATTCAGGCT	42	60
	3F	TTGCTTGGCATTTCACAAGTG	41	59
	3R	GTCCGGGTAGTGACGAAGTG	60	60
	4F	ACTTCGTCACTACCCGGACT	55	60
	4R	ATTGAGCTGAGTCATGTACCACA	43	60
	5F	TGACCACCCTGTCATGTGC	58	60
	5R	CAAACCAGCAACCACCCTTG	55	60
	6F	GGGTGGTTGCTGGTTTGGAT	55	61
	6R	CATGTGTAATGACAAAACATGGGG	42	59

(I) <i>LOC4342078</i>	1F	ACATGACACGACTGCTTCCG	55	61
	1R	CGCAAATCCAAGCAGCGAAG	55	61
	2F	GCTGCTTGGATTTGCGAACG	55	61
	2R	CATCGTACCCATAGCCCCAC	60	60
	3F	GTGGGGCTATGGGTACGATG	60	60
	3R	AGAAGCAGTACATGAAATTGGC	41	57
	4F	CCCCATCGCCAAGACTTCAA	55	60
	4R	CCTGGCTCAAACCTGATGCTC	55	59

(H)	7F	TGTCGGGATGCAAATGGAGA	50	59	(J)	1F	CTGACACCACAGCTGCCTTA	55	60
LOC9272377	7R	TACTGCACAGGACAATGAGGAC	50	59	LOC4342059	1R	ACCAGAGGGATAGGAGCAGG	60	60
	8F	AGGGGCATGTTTAGCGTCAA	50	60		2F	GGTAACGAACGCCATTTC	55	60
	8R	TGAATCCTCTGATTTTCAAGCAGG	42	59		2R	GCGAGCTCTGACCTTAGCTT	55	60
	9F	GAGATGGCCATGCACCACTT	55	61		3F	TGGCAGATGACAACGGCAAT	50	61
	9R	CCTGGTGCTTCCATCTGCAT	55	60		3R	TTGCATGCGTGTCAAGTAATCT	41	59
						4F	CTTCAGGGGGTAGTGCATCG	60	60
(K)	1F	TACCCACCCCGCATCCC	71	61		4R	CCACAAGCCATACCTAATACGGA	48	60
LOC4341953	1R	AAACGACCTTGTCAGGGGAG	55	60		5F	CCGTATTAGGTATGGCTTGTGG	50	59
	2F	AGCAGTGCTCTTGCTACTCG	55	60		5R	AGTGCTTGAACAGCGGTCAT	50	60
	2R	AGACAGTTCACCATCACCCG	55	60		6F	TGAAGAGGCGGGAGATACAC	55	59
	3F	GGTTGAATTTTCCACACCGGG	52	60		6R	ATTTCAAAGCACACCTCTGGCT	45	61
	3R	CCAATGCTAAGCTAGCACCA	50	58		7F	TCTCAGATTACTTGACACGCA	43	57
	4F	TGTGTAGGATGCAGCGCAAT	50	60		7R	CTAGCAATTCTCCTCCCTCACA	50	59
	4R	TGGGATTTTCTCTACTTACTCAGC	40	59		8F	AGCTCATCCTTGGTTGCGAG	55	60
	5F	CTACACCTATGATGCGTCGTG	52	59		8R	TATGGTAAACTCACCGTCCGAAA	43	60
	5R	TTTATAGGTACCTTGTTTGCCCA	39	58		9F	TTTGAAGAGTTCTGTGCCGC	50	59
	6F	CACCTTACCTCATAAATGTGGAATC	40	58		9R	GGTGTCAGATGGGATCATGGA	52	59
	6R	TGAATAGGTGTGGGAGGTGC	55	59		9R	GGTGTCAGATGGGATCATGGA	52	59
	7F	CCTCCACAGAATGGAAGTGCT	52	60					
	7R	TGGCCAGCAAAACGGTAAC	53	59					

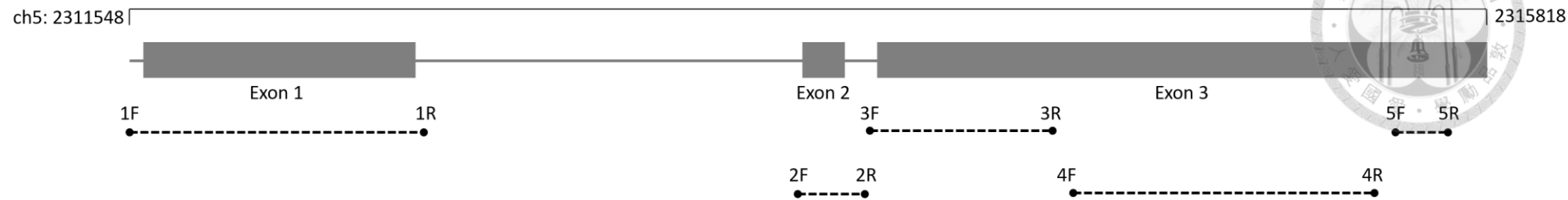
(A) *LOC107277971*(B) *LOC4337852*(C) *LOC4337815*(D) *LOC4337718*(E) *LOC9271771*

圖十、*qLTT-5* 及 *qLTT-6* 區間內水稻耐寒相關轉錄體片段擴增之引子位置示意圖
實心長方形表示 exon，實線表示 intron，下方虛線表示引子對及擴增範圍

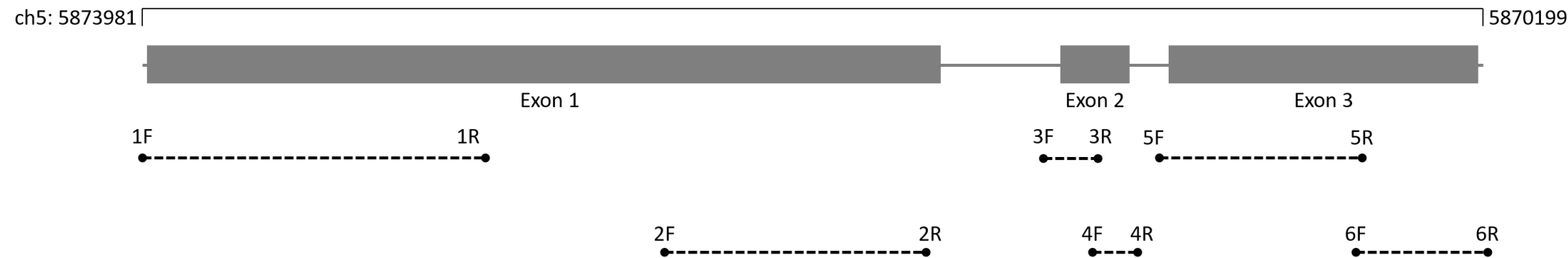
Figure 10. Primers used to amplify rice cold tolerance transcriptomes located in *qLTT-5* and *qLTT-6* intervals



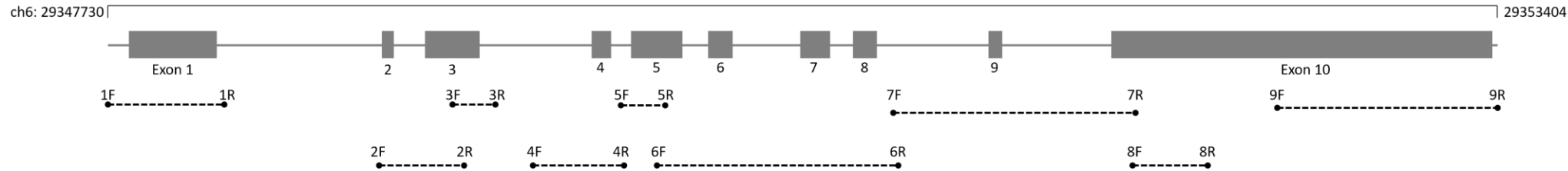
(F) *LOC4337756*



(G) *LOC4338039*



(H) *LOC9272377*



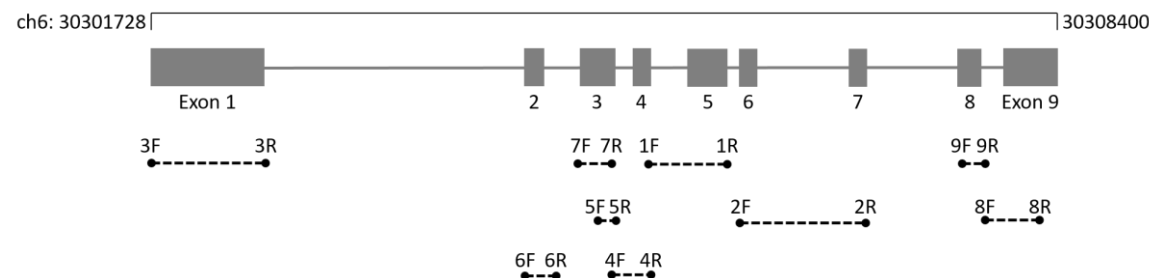
(續圖十)



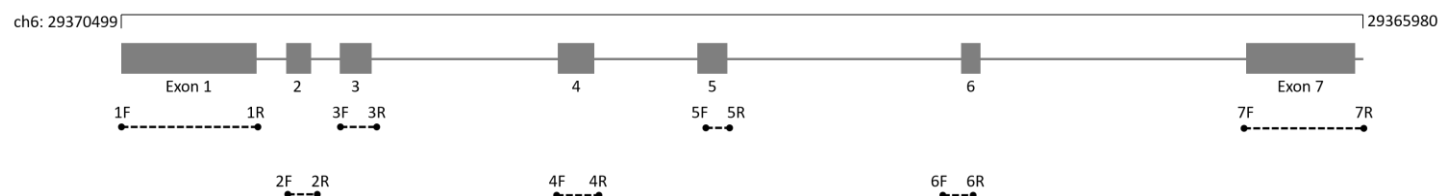
(I) *LOC4342078*



(J) *LOC4342059*



(K) *LOC4341953*



圖十一、*qLTT-5* 及 *qLTT-6* 區間內水稻耐寒相關轉錄體片段擴增之引子位置示意圖。

實心長方形表示 exon，實線表示 intron，下方虛線表示引子對及擴增範圍。

Figure 10. Primers used to amplify rice cold tolerance transcriptomes located in *qLTT-5* and *qLTT-6* intervals.

Shaded boxes represent exons and solid lines represent introns. Dotted lines below represent the regions amplified with primers used to confirm the sequences



六、 輔助選拔苗期耐寒性基因型之分子標誌推薦

分子標誌輔助選拔在當代育種工作中扮演極重要角色，能夠在早世代進行基因型篩選，進而加速育種流程。本研究以 $F_{2:3}$ 世代品系為材料，經低溫處理後目測評估外表型，共定位到四個與水稻苗期耐寒性相關之 QTL，其中 *qLTT-5* 及 *qLTT-6* 兩 QTL 具較高之加性效應，且對苗期耐寒性有較大的影響。因此本研究為探討此二個 QTL 於未來臺灣水稻耐寒性育種的應用性，檢視與此二個 QTL 分別最鄰近的分子標誌 (RM17764 及 CH0629) 之基因型以及耐寒外表型，以期獲得能實際應用之分子標誌。結果顯示，當 RM17764 及 CH0629 兩分子標誌基因型皆來自 Mi 時，該品系之耐寒等級皆為 2，與 Mi 具同等耐寒性。以此項標準於試驗族群中進行篩選，篩選出耐寒等級為 2 的品系 (共 5 個品系，佔族群 4.8 %)其正確率為 100 %，因此本研究推薦 RM17764 及 CH0629 兩分子標誌，預期其可應用在未來臺灣水稻苗期耐寒性的改良上。

七、 現況困難與未來展望

隨著極端氣候發生的頻率增加及預期未來人口成長，水稻的耐寒性對於全球稻米生產潛力與產量穩定性都具有相當的重要性。雖說水稻耐寒性在生理特徵、QTL 定位、基因探勘及生化代謝方面至今均已累積許多研究結果，但由於耐寒性性狀複雜，水稻耐寒性的實際育種成果仍然有限，而其面臨的挑戰主要有三，分別討論如下：

(一) 水稻耐寒性由多基因所調控，在早期溫帶型梗稻耐寒性的研究中便指出耐寒性由四個以上的基因座所控制，後續的 QTL 定位結果亦在不同水稻試驗族群中皆定位到多個水稻耐寒性相關的 QTL。而就生理機制而言，耐寒反應並非由單一生化途徑所調控，而是由多個不同的生化途徑與機制所調節，與前述多基因調控的理論相符合。不過目前已選殖的水稻耐寒相關基因的數目仍有限，遠少於已發表的 QTL 數目，以致現今仍無法清楚了解耐寒機制的生化途徑 (Najeeb, 2021)。因此，當今水稻



耐寒性的育種需慎選耐寒品系為雜交親本，且亦需加深對耐寒反應生化機制的理解，以有效達到提高耐寒性之育種目標。

(二) 田間環境條件的不可預測性也是水稻耐寒性的育種上面臨的限制。耐逆境育種過程中必須經過選拔，故需要具適當逆境的試驗環境，但在自然環境下低溫壓力常需仰賴田區所處的地理位置及當地氣候，其溫度與影響期間長短亦皆難以預測，且每年變動甚大，導致能夠於田間選拔的環境相當有限 (Blum, 2018)。因此，水稻耐寒性相關的研究中常在溫室、生長箱及冰箱等評估各品系之耐寒性。雖能妥善調控低溫溫度及持續時間，但這些場所能夠處理的植株樣本有限，因此限制了試驗族群之大小，在育種上可能有流失有利基因型的風險，並提高試驗成本 (Snell et al., 2008)。除此之外，植株在自然田區遭逢低溫的耐寒反應常牽涉眾多環境因子，與人為低溫環境誘導的耐寒反應可能有所差異，此亦是耐寒性評估待解決的問題。雖有研究提出在田區內以低溫冷水灌溉之折衷方法，雖證實能夠成功進行耐寒性的辨別，但此方法成本較高，且得以有效實施的環境仍然受限 (Han et al., 2004; Zhang et al., 2014a)。綜上所述，可知建立水稻耐寒性的外表型選拔環境及方法，可能是當今急待克服的困難。

(三) 水稻耐寒性育種所面臨的最後一個困難為耐寒種原於秈梗兩主要栽培稻種間的偏差 (Bierlen et al., 1997)。由於大多耐寒種原皆屬於梗稻族群，少有耐寒之秈稻種原，造成秈稻品種之耐寒育種的成果有限。雖然可以透過秈梗雜交將梗稻的耐寒基因導入秈稻品種中，但秈梗稻之間常有雜交不親和之情形，且經常會影響到秈稻品種原先的優良性狀，雜交後代又常有低稔實率的情形 (Khush, 2005)。因此，秈梗兩主要栽培稻種間的種原差異亦是提升水稻耐寒性及維持水稻產量所需面對的挑戰。雖然目前水稻耐寒性育種雖仍面臨前述的挑戰，不過在外表型評估技術改進上，隨著生物資訊技術的成熟，大量田間環境因子資料的積累，在低溫處理試驗的設計上能夠更加貼近田間條件 (Bandyopadhyay and Sanyal, 2011)。此外，代謝物組學興起，能夠探討不同水稻品種於田間低溫反應下生化代謝層次的差異，可以應用於水稻耐寒性的 QTL 分析及育種上 (Pati et al., 2021)。另外，代謝物組學的分析結果亦能推



動系統生物學的研究，剖析更詳細豐富的水稻耐寒反應生化機制，以利未來育種利用。而已臻成熟的分子生物技術亦可能提供多元育種策略 (Zhang et al., 2014a)。例如基因轉殖能夠將外來物種的耐寒基因導入栽培種，可突破種原材料的利用限制 (Takesawa et al., 2002)。此外，亦可使用 RNA 干擾技術調節耐寒機制 (Yang et al., 2013a)。而基因編輯技術除了能夠針對耐寒性相關的 DNA 序列進行多位點的精確編輯，更能夠產生不帶有轉基因的品系，不過目前基因轉殖方法均仍受法規之限制 (Anzalone et al., 2019)。

稻米為全球一半以上人口之主食，亦是臺灣人民最主要糧食，更是臺灣產量及產值最大的糧食作物。儘管目前臺灣稻米生產充足，但為了在極端氣候頻發的未來仍能維持糧食安全及農民生計，培育出於苗期耐低溫寒害的水稻品種極具重要性。除了能夠維持稻作正常生長，維持一定產量不致影響糧食生產與農民收益，耐寒性狀也將有利於水稻直播栽培，降低農作成本。綜上所述，為因應極端氣候的頻繁，水稻耐寒性的改良為臺灣目前重要課題之一，又臺灣稻米生產以梗稻為大宗，故期望本論文探討的兩梗稻族群之耐寒性研究結果可以成為未來育種的參考。

結論



本研究以高度耐寒梗稻酒米品種（美山錦）與較不耐寒的梗稻品種（臺南 16 號）為雜交親本，利用所衍生之 $F_{2:3}$ 族群進行苗期耐寒性之基因定位，希望能了解苗期耐寒性之遺傳機制。本研究共定位到 4 個苗期耐寒性相關的 QTL，包括 qLTT-2、qLTT-5、qLTT-6 及 qLTT-7。其中 qLTT-2 與 qLTT-7 效應較小，耐寒外表型為隱性遺傳模式；qLTT-5 與 qLTT-6 效應較大，耐寒外表型為加性遺傳模式。本研究參考候選基因之 DNA 序列，進行兩親本之 DNA 定序，雖未能偵測得序列間之差異，但其結果亦可供後續基因選殖之參考，所設計之引子亦可供未來水稻耐寒研究使用。此外，本研究發現與 qLTT-5 及 qLTT-6 兩 QTL 連鎖之分子標誌 RM17764 及 CH0629 篩選耐寒個體的正确率可達 100 %，未來可有效應用於分子標誌輔助耐寒品系之選拔。

參考資料



- 丁文彥。2004 年 3 月。水稻秧苗寒害之預防。臺東區農業專訊 47:5-7。取自 <https://www.ttdares.gov.tw/ws.php?id=1380>
- 下野裕之。2018 年。イネの障害型冷害。日本作物學會紀事 87(2):113-124。
- 日本農林水產省。2021 年 12 月 28 日。令和 3 年産米の農産物検査結果（速報値）。
取自 <https://www.maff.go.jp/j/seisan/syoryu/kensa/kome/>
- 日本農林水產省。2021 年 9 月。日本酒をめぐる状況。取自 https://www.maff.go.jp/j/seisaku_tokatu/kikaku/sake.html
- 交通部中央氣象局。2021 年。466920 臺北觀測站月報表。取自 <https://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp>
- 行政院農業委員會農糧署。2021 年 7 月 6 日。農業統計年報(109 年)- 農業生產- 作物生產。取自 <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- 行政院農業委員會農糧署。2021 年 7 月 6 日。農業統計年報(109 年)- 農業災害- 農作物被害狀況。取自 <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- 行政院農業委員會農糧署。2021 年 8 月 30 日。農業統計年報(109 年)- 農業經濟指標- 農產品生產量值。取自 <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- 李超運。2000 年 12 月。水稻冷害原因及對策。花蓮區農業專訊 34:12-14。取自 <https://www.hdares.gov.tw/ws.php?id=792>
- 林芳洲、林孟輝。2000 年 9 月 1 日。桃園區農業改良場研究彙報 42: 13-21。取自 <https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh?docid=02575523-200009-201402250014-201402250014-13-21>
- 侯雅玲。2018 年 3 月。儲藏條件對白米品質的影響。臺東區農業專訊 103:19-21。取自 <https://www.ttdares.gov.tw/ws.php?id=7977>



連苡廷。2019 年。清酒用稻米性狀及抽穗期之基因定位。台灣大學農藝學研究所學位論文。取自

<https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh1?DocID=U0001-0708201911524800>

陳素娥、黃振增。2004 年 12 月。水稻新品種「桃園 3 號」香米之特性與栽培要點。桃園區農技報導第 27 期。取自 https://www.tydares.gov.tw/redirect_files

陳榮坤、劉祐廷。2019 年 12 月。臺版越光米水稻臺南 16 號的推廣成果與迴響。行政院農委會農政與農情 342:117-120。取自 <https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2511661>

黃益田。2007 年 11 月。植物保護圖鑑系列 8— 水稻保護(上冊)-寒害:395-398。取自 https://www.baphiq.gov.tw/Publish/plant_protect_pic_8/rice_index.html

劉祐廷、王聖善、陳榮坤。2020 年 12 月 16 日。秈稻幼苗耐寒性之近似同源系育成與數量性狀基因座探勘。臺南區農業改良場研究彙報 76: 25-36。取自 <https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh?docid=02556189-202012-202103220014-202103220014-25-36>

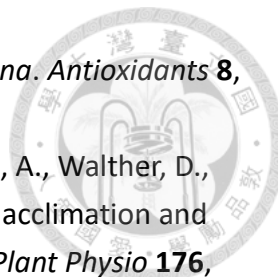
鄭智允、簡禎佑、楊志雄。2019 年 3 月。水稻寒冷害指標與調適策略。桃園區農業專訊 107:2-6。取自 <https://www.tydares.gov.tw/ws.php?id=6701>

Aarati, P., Krishnaprasad, B. T., Ganeshkumar, Savitha, M., Gopalakrishna, R., Ramamohan, G., and Udayakumar, M. (2003). Expression of an ABA responsive 21 kDa protein in finger millet (*Eleusine coracana Gaertn.*) under stress and its relevance in stress tolerance. *Plant Sci* **164**, 25-34.

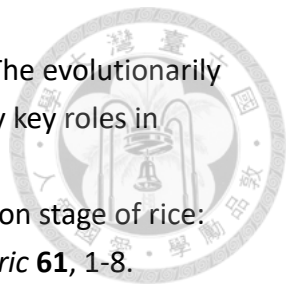
Abdelkrim, J., Robertson, B. C., Stanton, J.-A. L., and Gemmell, N. J. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* **46**, 185-192.

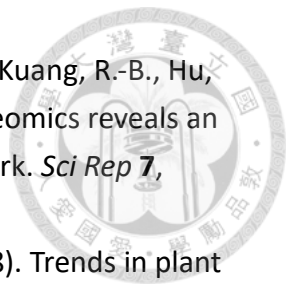
Abiola, O., Angel, J. M., Avner, P., Bachmanov, A. A., Belknap, J. K., Bennett, B., Blankenhorn, E. P., Blizard, D. A., Bolivar, V., Brockmann, G. A., Buck, K. J., Bureau, J. F., Casley, W. L., Chesler, E. J., Cheverud, J. M., Churchill, G. A., Cook, M., Crabbe, J. C., Crusio, W. E., Darvasi, A., de Haan, G., Dermant, P., Doerge, R. W., Elliot, R. W., Farber, C. R., Flaherty, L., Flint, J., Gershenfeld, H., Gibson, J. P., Gu, J., Gu, W., Himmelbauer, H., Hitzemann, R., Hsu, H. C., Hunter, K., Iraqi, F. F., Jansen, R. C., Johnson, T. E., Jones, B. C., Kempermann, G., Lammert, F., Lu, L., Manly, K. F.,

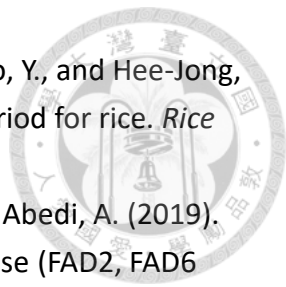
- 
- Matthews, D. B., Medrano, J. F., Mehrabian, M., Mittlemann, G., Mock, B. A., Mogil, J. S., Montagutelli, X., Morahan, G., Mountz, J. D., Nagase, H., Nowakowski, R. S., O'Hara, B. F., Osadchuk, A. V., Paigen, B., Palmer, A. A., Peirce, J. L., Pomp, D., Rosemann, M., Rosen, G. D., Schalkwyk, L. C., Seltzer, Z., Settle, S., Shimomura, K., Shou, S., Sikela, J. M., Siracusa, L. D., Spearow, J. L., Teuscher, C., Threadgill, D. W., Toth, L. A., Toye, A. A., Vadasz, C., Van Zant, G., Wakeland, E., Williams, R. W., Zhang, H. G., and Zou, F. (2003). The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet* **4**, 911-6.
- Ahlfors, R., Lång, S., Overmyer, K., Jaspers, P., Broscheé, M., Tauriainen, A., Kollist, H., Tuominen, H., Belles-Boix, E., Piippo, M., Inzé, D., Palva, E. T., and Kangasjärvi, J. (2004). Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein–protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *The Plant Cell* **16**, 1925-1937.
- Ali, A., Xu, J., Ismail, A., Fu, B., Vijaykumar, C., Gao, Y., Domingo, J., Maghirang, R., Yu, S., and Gregorio, G. (2006). Hidden diversity for abiotic and biotic stress tolerances in the primary gene pool of rice revealed by a large backcross breeding program. *Field Crops Res* **97**, 66-76.
- Andargie, M., Li, L., Feng, A., Zhu, X., and Li, J. (2018). Mapping of the quantitative trait locus (QTL) conferring resistance to rice false smut disease. *Curr Plant Bio* **15**, 38-43.
- Andaya, V., and Mackill, D. (2003a). QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a japonica× indica cross. *Theor Appl Genet* **106**, 1084-1090.
- Andaya, V. C., and Mackill, D. J. (2003b). Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *J Exp Bot* **54**, 2579-85.
- Andaya, V. C., and Tai, T. H. (2006). Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theor Appl Genet* **113**, 467-75.
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., and Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149-157.
- Baltazar, M. D., Ignacio, J. C. I., Thomson, M. J., Ismail, A. M., Mendioro, M. S., and Septiningsih, E. M. (2019). QTL mapping for tolerance to anaerobic germination in rice from IR64 and the aus landrace Kharsu 80A. *Breed Sci* **69**, 227-233.
- Bandyopadhyay, S. K., and Sanyal, P. (2011). Application of intelligent techniques towards improvement of crop productivity. *Int Eng Sci Technol* **3**(1), 52-54.
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Gómez-Rodríguez, M. V., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Corpas, F. J., and Barroso, J. B. (2019). Short-term low temperature induces nitro-oxidative stress that deregulates the NADP-

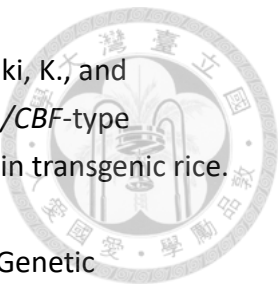
- 
- malic enzyme function by tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants* **8**, 448.
- Beine-Golovchuk, O., Firmino, A. A. P., Dąbrowska, A., Schmidt, S., Erban, A., Walther, D., Zuther, E., Hinch, D. K., and Kopka, J. (2018). Plant temperature acclimation and growth rely on cytosolic ribosome biogenesis factor homologs. *Plant Physiol* **176**, 2251-2276.
- Bertin, P., Kinet, J., and Bouharmont, J. (1996). Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* **89**, 201-210.
- Bierlen, R., Wailes, E. J., and Cramer, G. L. (1997). The Mercosur rice economy.
- Biswas, P. S., Khatun, H., Das, N., Sarker, M., and Anisuzzaman, M. (2017). Mapping and validation of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice from an indica cultivar Habiganj Boro VI (Hbj. BVI). *3 Biotech*, **7**(6), 1-12.
- Blum, A. (2018). "Plant breeding for stress environments," CRC press.
- Bond, D. M., Dennis, E. S., and Finnegan, E. J. (2011). The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. *Plant Cell Environ* **34**, 1737-1748.
- Bonnecarrere, V., Borsani, O., Diaz, P., Capdevielle, F., Blanco, P., and Monza, J. (2011). Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependent. *Plant Sci* **180**, 726-32.
- Broman, K. W., and Sen, S. (2009). "A Guide to QTL Mapping with R/qtl," Springer.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**, 889-890.
- Byeon, Y., Park, S., Kim, Y. S., and Back, K. (2013). Microarray analysis of genes differentially expressed in melatonin-rich transgenic rice expressing a sheep serotonin N-acetyltransferase. *J Pineal Res* **55**, 357-63.
- Cao, J., Li, X., and Lv, Y. (2017). Dynein light chain family genes in 15 plant species: Identification, evolution and expression profiles. *Plant Sci* **254**, 70-81.
- Cao, S., Wang, Y., Li, Z., Shi, W., Gao, F., Zhou, Y., Zhang, G., and Feng, J. (2019). Genome-wide identification and expression analyses of the chitinases under cold and osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus*. *Genes* **10**, 472.
- Cao, Y., Wu, Y., Zheng, Z., and Song, F. (2005). Overexpression of the rice EREBP-like gene OsBIERF3 enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco. *Physiol Mol* **67**, 202-211.
- Capovilla, G., Pajoro, A., Immink, R. G. H., and Schmid, M. (2015). Role of alternative pre-mRNA splicing in temperature signaling. *Curr Opin Plant Biol* **27**, 97-103.
- Catalá, R., López-Cobollo, R., Mar Castellano, M., Angosto, T., Alonso, J. M., Ecker, J. R., and Salinas, J. (2014). The *Arabidopsis* 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links

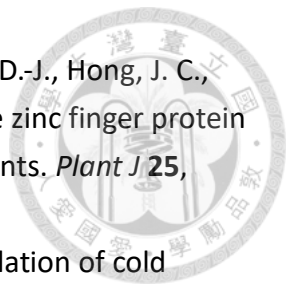
- low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation *The Plant Cell* **26**, 3326-3342.
- Che, Y., Zhang, N., Zhu, X., Li, S., Wang, S., and Si, H. (2020). Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Sci Hortic* **261**, 108949.
- Chen, J., Yuan, D.-b., Wang, C.-z., Li, Y.-x., Li, F.-f., Hong, K.-q., and Lu, W.-j. (2015). MaRING2: a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to cold stress from banana fruit. *J Amer Soc Hort Sci* **140**, 373-382.
- Chen, N., Song, B., Tang, S., He, J., Zhou, Y., Feng, J., Shi, S., and Xu, X. (2018). Overexpression of the ABC transporter gene TsABCG11 increases cuticle lipids and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol Rep* **12**, 303-313.
- Chen, N., Xu, Y., Wang, X., Du, C., Du, J., Yuan, M., Xu, Z., and Chong, K. (2011). OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell Environ* **34**, 52-64.
- Chen, N., Yang, Q., Hu, D., Pan, L., Chi, X., Chen, M., Yang, Z., Wang, T., Wang, M., He, Y., and Yu, S. (2014). Gene expression profiling and identification of resistance genes to low temperature in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Sci Hortic* **169**, 214-225.
- Chen, R., Ma, J., Luo, D., Hou, X., Ma, F., Zhang, Y., Meng, Y., Zhang, H., and Guo, W. (2019). CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress. *Plant Sci* **280**, 164-174.
- Cheng, L. R., Wang, J. M., Uzokwe, V., Meng, L. J., Wang, Y., Sun, Y., and Li, Z. K. (2012). Genetic analysis of cold tolerance at seedling stage and heat tolerance at anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Integr Agric* **11**(3), 359-367.
- Choder, M., and Young, R. A. (1993). A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol* **13**, 6984-6991.
- Chou, W.-L., Huang, L.-F., Fang, J.-C., Yeh, C.-H., Hong, C.-Y., Wu, S.-J., and Lu, C.-A. (2014). Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in *Oryza sativa*. *Plant Mol Biol* **85**, 443-458.
- Chung, S. M., and Staub, J. E. (2003). The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theor Appl Genet* **107**, 757-67.
- Churbanov, A., Ryan, R., Hasan, N., Bailey, D., Chen, H., Milligan, B., and Houde, P. (2012). HighSSR: high-throughput SSR characterization and locus development from next-gen sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 2797-2803.

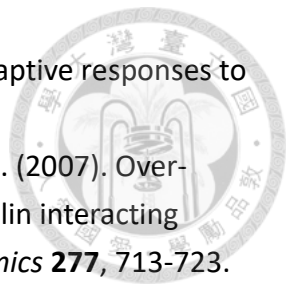
- 
- Ciuzan, O., Hancock, J., Pamfil, D., Wilson, I., and Ladomery, M. (2015). The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. *Physiol Plant* **153**, 1-11.
- Cruz, R. P. d., and Milach, S. C. K. (2004). Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. *Sci Agric* **61**, 1-8.
- Dametto, A., Sperotto, R. A., Adamski, J. M., Blasi, É. A. R., Cargnelutti, D., de Oliveira, L. F. V., Ricachenevsky, F. K., Fregonezi, J. N., Mariath, J. E. A., da Cruz, R. P., Margis, R., and Fett, J. P. (2015). Cold tolerance in rice germinating seeds revealed by deep RNAseq analysis of contrasting indica genotypes. *Plant Sci* **238**, 1-12.
- Das, A., Pramanik, K., Sharma, R., Gantait, S., and Banerjee, J. (2019). In-silico study of biotic and abiotic stress-related transcription factor binding sites in the promoter regions of rice germin-like protein genes. *Plos One* **14**, e0211887.
- Daware, A., Das, S., Srivastava, R., Badoni, S., Singh, A. K., Agarwal, P., Parida, S. K., and Tyagi, A. K. (2016). An efficient strategy combining SSR markers-and advanced QTL-seq-driven QTL mapping unravels candidate genes regulating grain weight in rice. *Front Plant Sci* **7**, 1535.
- Dharshini, S., Hoang, N. V., Mahadevaiah, C., Sarath Padmanabhan, T. S., Alagarasan, G., Suresha, G. S., Kumar, R., Meena, M. R., Ram, B., and Appunu, C. (2020). Root transcriptome analysis of *Saccharum spontaneum* uncovers key genes and pathways in response to low-temperature stress. *Environ Exp Bot* **171**, 103935.
- FAO. Retrieved September 15, 2021, from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fang, J.-C., Tsai, Y.-C., Chou, W.-L., Liu, H.-Y., Chang, C.-C., Wu, S.-J., and Lu, C.-A. (2021). A CCR4-associated factor 1, OsCAF1B, confers tolerance of low-temperature stress to rice seedlings. *Plant Mol Biol* **105**, 177-192.
- Finka, A., Cuendet, A. F. H., Maathuis, F. J., Saidi, Y., and Goloubinoff, P. (2012). Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *The Plant Cell* **24**, 3333-3348.
- Fjellstrom, R., Conaway-Bormans, C. A., McClung, A. M., Marchetti, M. A., Shank, A. R., and Park, W. D. (2004). Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three Pi genes conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes. *Crop Sci*, **44**(5), 1790-1798.
- Fujino, K., and Matsuda, Y. (2009). Genome-wide analysis of genes targeted by qLTG3-1 controlling low-temperature germinability in rice. *Plant Mol Biol* **72**, 137.
- Fukagawa, N. K., and Ziska, L. H. (2019). Rice: Importance for Global Nutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **65**, S2-s3.
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., and Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 207-209.

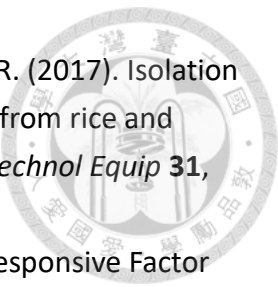
- 
- Gao, J., Zhang, S., He, W.-D., Shao, X.-H., Li, C.-Y., Wei, Y.-R., Deng, G.-M., Kuang, R.-B., Hu, C.-H., Yi, G.-J., and Yang, Q.-S. (2017). Comparative phosphoproteomics reveals an important role of MKK2 in banana (*Musa* spp.) cold signal network. *Sci Rep* **7**, 40852.
- Garrido-Cardenas, J. A., Mesa-Valle, C., and Manzano-Agugliaro, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta* **247**, 543-557.
- Ge, L.-F., Chao, D.-Y., Shi, M., Zhu, M.-Z., Gao, J.-P., and Lin, H.-X. (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* **228**, 191-201.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W. L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R. M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., and Briggs, S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* **296**, 92-100.
- Gothandam, K. M., Nalini, E., Karthikeyan, S., and Shin, J. S. (2009). *OsPRP3*, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-tolerance. *Plant Mol Biol* **72**, 125.
- Goulas, E., Richard-Molard, C., Le Dily, F., Le Dantec, C., Ozouf, J., and Ourry, A. (2007). A cytosolic vegetative storage protein (TrVSP) from white clover is encoded by a cold-inducible gene. *Physiol Plant* **129**, 567-577.
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., and Bitonti, M. B. (2012). In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J Exp Bot* **63**, 695-709.
- Gu, Z., Ma, B., Jiang, Y., Chen, Z., Su, X., and Zhang, H. (2008). Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses. *Gene* **415**, 1-12.
- Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M., and Zhu, J.-K. (2002). An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of *CBF/DREB1* transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 7786-7791.
- Hamada, H., and Kakunaga, T. (1982). Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* **298**, 396-398.

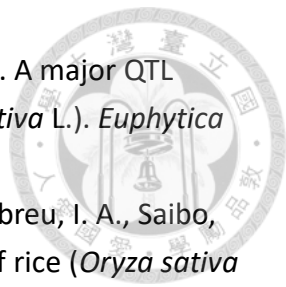
- 
- Han, L.-Z., Yong-Li, Q., Gui-Lan, C., Yuan-Yuan, Z., Yong-Ping, A., Jong-Doo, Y., and Hee-Jong, K. (2004). QTLs analysis of cold tolerance during early growth period for rice. *Rice Sci* **11**, 245-250.
- Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Sohani, M. M., Ghazvini, R. F., and Abedi, A. (2019). Effects of Freezing stress on the expression of fatty acid desaturase (FAD2, FAD6 and FAD7) and beta-glucosidase (BGLC) genes in tolerant and sensitive olive cultivars. *Russ J Plant Physiol* **66**, 214-222.
- He, Y.-M., Liu, K.-K., Zhang, H.-X., Cheng, G.-X., Ali, M., Ul Haq, S., Wei, A.-M., and Gong, Z.-H. (2019). Contribution of *CaBPM4*, a BTB domain-containing gene, to the response of pepper to *Phytophthora capsici* infection and abiotic stresses. *Agron* **9**, 417.
- Hemsley, P. A., Hurst, C. H., Kaliyadasa, E., Lamb, R., Knight, M. R., De Cothi, E. A., Steele, J. F., and Knight, H. (2014). The Arabidopsis mediator complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate mediator and RNA polymerase ii recruitment to CBF-responsive cold-regulated genes. *The Plant Cell* **26**, 465-484.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., and Xiong, L. (2008). Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol* **67**, 169-181.
- Hu, T., Wang, Y., Wang, Q., Dang, N., Wang, L., Liu, C., Zhu, J., and Zhan, X. (2019). The tomato 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase gene *SIF3HL* is critical for chilling stress tolerance. *Hortic Res* **6**:45, 1-12
- Hu, X., Liu, L., Xiao, B., Li, D., Xing, X., Kong, X., and Li, D. (2010). Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by over-expression of a new maize protein phosphatase 2C, *ZmPP2C2*. *J Plant Physiol* **167**, 1307-1315.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Lan, H., Sun, H., Wang, Z., Bao, Y., Wang, J., Tang, H., and Zhang, H. (2012). A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **80**, 337-350.
- Ilk, N., Ding, J., Ihnatowicz, A., Koornneef, M., and Reymond, M. (2015). Natural variation for anthocyanin accumulation under high-light and low-temperature stress is attributable to the ENHANCER OF AG-4 2 (HUA2) locus in combination with PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (PAP1) and PAP2. *New Phytol* **206**, 422-435.
- International Rice Genome Sequencing, P. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.
- IRRI (2002) Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines

- 
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of rice *DREB1/CBF*-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* **47**, 141-153.
- Jahan, N., Javed, M. A., Khan, A., Manan, F. A., and Tabassum, B. (2021). Genetic architecture of Al^{3+} toxicity tolerance in rice $F_{2:3}$ populations determined through QTL mapping. *Ecotoxicology* **30**, 794-805.
- Jiang, L., Liu, S., Hou, M., Tang, J., Chen, L., Zhai, H., & Wan, J. (2006). Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Res* **98**(1), 68-75.
- Jiang, L., Xun, M., Wang, J., and Wan, J. (2008). QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *J Cereal Sci* **48**, 173-179.
- Jing, P., Zou, J., Kong, L., Hu, S., Wang, B., Yang, J., and Xie, G. (2016). *OsCCD1*, a novel small calcium-binding protein with one EF-hand motif, positively regulates osmotic and salt tolerance in rice. *Plant Sci* **247**, 104-114.
- Ji, Z. J., Zeng, Y. X., Zeng, D. L., Li, X. M., Liu, B. X., & Yang, C. D. (2010). Identification of QTLs for rice cold tolerance at plumule and 3-leaf-seedling stages by using QTLNetwork software. *Rice Sci* **17**(4), 282-287.
- Joo, J., Lee, Y. H., Kim, Y.-K., Nahm, B. H., and Song, S. I. (2013). Abiotic stress responsive rice *ASR1* and *ASR3* exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. *Mol Cells* **35**, 421-435.
- Jung, H. J., Park, S. J., and Kang, H. (2013). Regulation of RNA metabolism in plant development and stress responses. *J Plant Biol* **56**, 123-129.
- Kang, C. H., Lee, Y. M., Park, J. H., Nawkar, G. M., Oh, H. T., Kim, M. G., Lee, S. I., Kim, W. Y., Yun, D.-J., and Lee, S. Y. (2016). Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant Cell Environ* **39**, 1631-1642.
- Kang, K., Lee, K., Park, S., Kim, Y. S., and Back, K. (2010). Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J Pineal Res* **49**, 176-182.
- Kanneganti, V., and Gupta, A. K. (2008). Overexpression of *OsiSAP8*, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Mol Biol* **66**, 445-462.
- Kebriyae, D., Kordrostami, M., Rezadoost, M. H., and Lahiji, H. S. (2012). QTL analysis of agronomic traits in rice using SSR and AFLP markers. *Not Sci Biol* **4**, 116-123.
- Khush, G. S. (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol* **59**, 1-6.

- 
- Kim, J. C., Lee, S. H., Cheong, Y. H., Yoo, C.-M., Lee, S. I., Chun, H. J., Yun, D.-J., Hong, J. C., Lee, S. Y., Lim, C. O., and Cho, M. J. (2001). A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, *SCOF-1*, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* **25**, 247-259.
- Kim, S.-H., Kim, J.-Y., Kim, S.-J., An, K.-S., An, G., and Kim, S.-R. (2007). Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the *OsLti6b* gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* **26**, 1097-1110.
- Kim, S.-I., and Tai, T. H. (2011). Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica* **178**, 437-447.
- Kim, S.-J., Lee, S.-C., Hong, S. K., An, K., An, G., and Kim, S.-R. (2009). Ectopic expression of a cold-responsive *OsAsr1* cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants. *Mol Cells* **27**, 449-458.
- Kim, S., Kang, J. y., Cho, D. I., Park, J. H., and Kim, S. Y. (2004). *ABF2*, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* **40**, 75-87.
- Kim, S. A., Ahn, S. Y., and Yun, H. K. (2016). Transcriptome analysis of grapevine shoots exposed to chilling temperature for four weeks. *Hortic Environ Biotechnol* **57**, 161-172.
- Kim, S. M., Suh, J. P., Lee, C. K., Lee, J. H., Kim, Y. G., and Jena, K. K. (2014). QTL mapping and development of candidate gene-derived DNA markers associated with seedling cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genomics* **289**, 333-43.
- Kim, Y.-O., Kim, J. S., and Kang, H. (2005). Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **42**, 890-900.
- Kim, Y. S., An, C., Park, S., Gilmour, S. J., Wang, L., Renna, L., Brandizzi, F., Grumet, R., and Thomashow, M. F. (2017). CAMTA-mediated regulation of salicylic acid immunity pathway genes in *Arabidopsis* exposed to low temperature and pathogen infection. *The Plant Cell* **29**, 2465-2477.
- Koehler, G., Wilson, R. C., Goodpaster, J. V., Sønsteby, A., Lai, X., Witzmann, F. A., You, J.-S., Rohloff, J., Randall, S. K., and Alsheikh, M. (2012). Proteomic study of low-temperature responses in strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa*) that differ in cold tolerance. *Plant Physiol* **159**, 1787-1805.
- Koh, S., Lee, S.-C., Kim, M.-K., Koh, J. H., Lee, S., An, G., Choe, S., and Kim, S.-R. (2007). T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis* *BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* **65**, 453-466.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M. G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J. M., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. (2003). The STT3a Subunit

- 
- Isoform of the *Arabidopsis* oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *The Plant Cell* **15**, 2273-2284.
- Komatsu, S., Yang, G., Khan, M., Onodera, H., Toki, S., and Yamaguchi, M. (2007). Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. *Mol Genet Genomics* **277**, 713-723.
- Kong, D., Li, M., Dong, Z., Ji, H., and Li, X. (2015). Identification of TaWD40D, a wheat WD40 repeat-containing protein that is associated with plant tolerance to abiotic stresses. *Plant Cell Rep* **34**, 395-410.
- Koseki, M., Kitazawa, N., Yonebayashi, S., Maehara, Y., Wang, Z. X., and Minobe, Y. (2010). Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage. *Mol Genet Genomics* **284**, 45-54.
- Kumar, K., Rao, K. P., Sharma, P., and Sinha, A. K. (2008). Differential regulation of rice mitogen activated protein kinase kinase (MKK) by abiotic stress. *Plant Physiol Bioch* **46**, 891-897.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.-Y., and Vierstra, R. D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*: accumulation of SUMO1 and-2 conjugates is increased by stress. *J Bio Chem* **278**, 6862-6872.
- Lateef, D. D. (2015). DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. *J Biosci Med* **03**, 7-18.
- Li, G.-W., Zhang, M.-H., Cai, W.-M., Sun, W.-N., and Su, W.-A. (2008). Characterization of *OsPIP2; 7*, a water channel protein in rice. *Plant Cell Physiol* **49**, 1851-1858.
- Li, H.-W., Zang, B.-S., Deng, X.-W., and Wang, X.-P. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* **234**, 1007-1018.
- Li, P., Li, Y.-J., Zhang, F.-J., Zhang, G.-Z., Jiang, X.-Y., Yu, H.-M., and Hou, B.-K. (2017a). The *Arabidopsis* UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation. *The Plant J* **89**, 85-103.
- Li, T., Yun, Z., Zhang, D., Yang, C., Zhu, H., Jiang, Y., and Duan, X. (2015). Proteomic analysis of differentially expressed proteins involved in ethylene-induced chilling tolerance in harvested banana fruit. *Front Plant Sci* **6**:845, 1-14
- Li, X., Han, H., Chen, M., Yang, W., Liu, L., Li, N., Ding, X., and Chu, Z. (2017b). Overexpression of *OsDT11*, which encodes a novel cysteine-rich peptide, enhances drought tolerance and increases ABA concentration in rice. *Plant Mol Biol* **93**, 21-34.

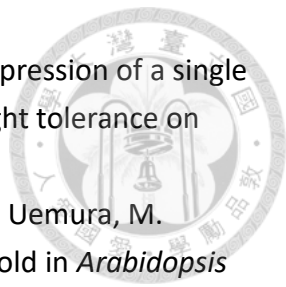
- 
- Liao, Y., Hu, C., Zhang, X., Cao, X., Xu, Z., Gao, X., Li, L., Zhu, J., and Chen, R. (2017). Isolation of a novel leucine-rich repeat receptor-like kinase (*OsLRR2*) gene from rice and analysis of its relation to abiotic stress responses. *Biotechnol Biotechnol Equip* **31**, 51-57.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., and Perata, P. (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (*AP2/ERF*) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol* **199**, 639-649.
- Lim, C. W., and Lee, S. C. (2014). Functional roles of the pepper MLO protein gene, *CaMLO2*, in abscisic acid signaling and drought sensitivity. *Plant Mol Biol* **85**, 1-10.
- Lin, D., Kong, R., Chen, L., Wang, Y., Wu, L., Xu, J., Piao, Z., Lee, G., and Dong, Y. (2020). Chloroplast development at low temperature requires the pseudouridine synthase gene TCD3 in rice. *Sci Rep* **10**, 8518.
- Liu, C., Wu, Y., and Wang, X. (2012). bZIP transcription factor *OsbZIP52/RISBZ5*: a potential negative regulator of cold and drought stress response in rice. *Planta* **235**, 1157-1169.
- Liu, F., Xu, W., Song, Q., Tan, L., Liu, J., Zhu, Z., Fu, Y., Su, Z., and Sun, C. (2013). Microarray-assisted fine-mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in rice. *Mol Plant* **6**, 757-767.
- Liu, K., Wang, L., Xu, Y., Chen, N., Ma, Q., Li, F., and Chong, K. (2007). Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta* **226**, 1007-1016.
- Liu, Y., Tabata, D., and Imai, R. (2016). A cold-inducible DEAD-box rna helicase from *Arabidopsis thaliana* regulates plant growth and development under low temperature. *Plos One* **11**, e0154040.
- Liu, Y., Zhang, H., Li, X., Wang, F., Lyle, D., Sun, L., Wang, G., Wang, J., Li, L., Gu, R., and Lübberstedt, T. (2018). Quantitative trait locus mapping for seed artificial aging traits using an $F_{2:3}$ population and a recombinant inbred line population crossed from two highly related maize inbreds. *Plant Breed* **138**(1), 29-37.
- Llorente, F., López-Cobollo, R. M., Catalá, R., Martínez-Zapater, J. M., and Salinas, J. (2002). A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *The Plant J* **32**, 13-24.
- Lone, J., Khan, M., Bhat, M., Shikari, A., Wani, S., Sofi, N., Khan, M., and Lone, R. (2018). Cold tolerance at germination and seedling stages of rice: methods of evaluation and characterization of thirty rice genotypes under stress conditions. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **7**, 1103-1109.

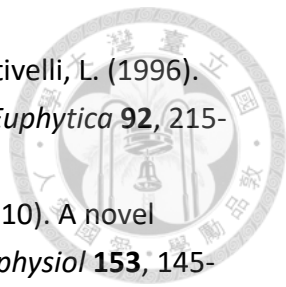
- 
- Lou, Q., Chen, L., Sun, Z., Xing, Y., Li, J., Xu, X., Mei, H., and Luo, L. (2007). A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **158**, 87-94.
- Lourenço, T., Sapeta, H., Figueiredo, D. D., Rodrigues, M., Cordeiro, A., Abreu, I. A., Saibo, N. J., and Oliveira, M. M. (2013). Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase *OsHOS1* gene in the modulation of cold stress response. *Plant Mol Biol* **83**, 351-363.
- Lugassi, N., Yadav, B. S., Egbaria, A., Wolf, D., Kelly, G., Neuhaus, E., Raveh, E., Carmi, N., and Granot, D. (2019). Expression of Arabidopsis hexokinase in tobacco guard cells increases water-use efficiency and confers tolerance to drought and salt stress. *Plants* **8**, 613.
- Luo, T., Zhang, Y., Zhang, C., Nelson, M. N., Yuan, J., Guo, L., and Xu, Z. (2021). Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed vigor under low-temperature conditions in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plants* **10**, 426.
- Lv, J., Dai, C.-B., Wang, W.-F., and Sun, Y.-H. (2021). Genome-wide identification of the tobacco GDSL family and apical meristem-specific expression conferred by the GDSL promoter. *BMC Plant Biol* **21**, 501.
- Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., Guo, J., Liu, Y., Chen, N., Xiao, J., Zhang, D., Xu, Z., and Zhang, X. (2009). Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiol* **150**, 244-256.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Qian, Q., Ge, S., and Chong, K. (2015). *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell* **160**, 1209-21.
- Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., and Jing, R. (2009). *TaSnRK2.4*, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61**, 683-696.
- Melencion, S. M. B., Chi, Y. H., Pham, T. T., Paeng, S. K., Wi, S. D., Lee, C., Ryu, S. W., Koo, S. S., and Lee, S. Y. (2017). RNA chaperone function of a universal stress protein in *Arabidopsis* confers enhanced cold stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* **18**, 2546.
- Meng, J., Hu, B., Yi, G., Li, X., Chen, H., Wang, Y., Yuan, W., Xing, Y., Sheng, Q., Su, Z., and Xu, C. (2020). Genome-wide analyses of banana fasciclin-like AGP genes and their differential expression under low-temperature stress in chilling sensitive and tolerant cultivars. *Plant Cell Rep* **39**, 693-708.
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam Kh, N., and Latif, M. A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int J Mol Sci* **14**, 22499-528.

- 
- Modareszadeh, M., Bahmani, R., Kim, D., and Hwang, S. (2021). CAX3 (cation/proton exchanger) mediates a Cd tolerance by decreasing ROS through Ca elevation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **105**, 115-132.
- Muñoz-Amatriaín, M., Hernandez, J., Herb, D., Baenziger, P. S., Bochard, A. M., Capettini, F., Casas, A., Cuesta-Marcos, A., Einfeldt, C., Fisk, S., Genty, A., Helgersson, L., Herz, M., Hu, G., Igartua, E., Karsai, I., Nakamura, T., Sato, K., Smith, K., Stockinger, E., Thomas, W., and Hayes, P. (2020). Perspectives on low temperature tolerance and vernalization sensitivity in barley: prospects for facultative growth habit. *Front Plant Sci* **11**:585927, 1-15.
- Najeeb. S., Mahender., A., Anandan., A., Hussain., W., Li., Z., Ali., J. (2021) Genetics and breeding of low-temperature stress tolerance in rice. from Ali, J. and Wani, S. H. (2021). "Rice Improvement: Physiological, Molecular Breeding and Genetic Perspectives". Springer Nature, 221-280.
- Nakashima, K., Tran, L. S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant J* **51**, 617-630.
- Nalley, L., Tack, J., Durand, A., Thoma, G., Tsiaboe, F., Shew, A., and Barkley, A. (2017). The production, consumption, and environmental impacts of rice hybridization in the United States. *Agron J* **109**, 193-203.
- Nishikawa, T., Vaughan, D. A., and Kadowaki, K. (2005). Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theor Appl Genet* **110**, 696-705.
- Niu, Z., Liu, L., Pu, Y., Ma, L., Wu, J., Hu, F., Fang, Y., Li, X., Sun, W., Wang, W., and Bai, C. (2021). iTRAQ-based quantitative proteome analysis insights into cold stress of Winter Rapeseed (*Brassica rapa* L.) grown in the field. *Sci Rep* **11**, 23434.
- Oliveira, D. E., Seurinck, J., Inzé, D., Van Montagu, M., and Botterman, J. (1990). Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. *The Plant Cell* **2**, 427-436.
- Pan, Y., Wang, W., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., and Li, Z. (2011). DNA methylation alterations of rice in response to cold stress. *Plant Omics J* **4**, 364-369.
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., and Jugulam, M. (2020). Role of cytochrome p450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants* **9**, 454.
- Park, H.-Y., Kang, I. S., Han, J.-S., Lee, C.-H., An, G., and Moon, Y.-H. (2009). *OsDEG10* encoding a small RNA-binding protein is involved in abiotic stress signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 597-602.

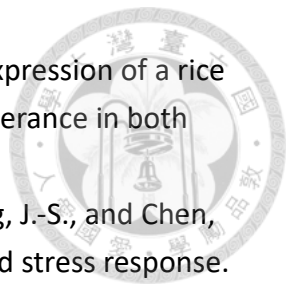


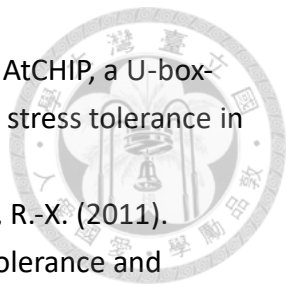
- Park, I.-K., Oh, C.-S., Kim, D.-M., Yeo, S.-M., and Ahn, S.-N. (2013). QTL mapping of cold tolerance at the seedling stage using introgression lines derived from an intersubspecific cross in rice. *Plant Breed Biotech* **1**, 1-8.
- Park, S., and Back, K. (2012). Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination. *J Pineal Res* **53**, 385-389.
- Pati, P., Donde, R., Sabarinathan, S., Gouda, G., Gupta, M. K., and Rathore, S. K. (2021). Metabolomics in rice improvement. from Gupta, M. K., and Behera, L. (Eds.). (2021). "*Applications of Bioinformatics in Rice Research*". Springer Singapore.
- Pelagio-Flores, R., Muñoz-Parra, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Saenz-Mata, J., Ortega-Amaro, M. A., Jiménez-Bremont, J. F., and López-Bucio, J. (2019). The cysteine-rich receptor-like protein kinase CRK28 modulates Arabidopsis growth and development and influences abscisic acid responses. *Planta* **251**, 2.
- Pinhero, R. G., Paliyath, G., Yada, R. Y., and Murr, D. P. (1998). Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol Bioch* **36**, 213-224.
- Prasad, T. K. (1997). Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent Maize seedlings. *Plant Physiol* **114**, 1369-1376.
- Qian, Y., Zhang, T., Yu, Y., Gou, L., Yang, J., Xu, J., and Pi, E. (2021). Regulatory mechanisms of bHLH transcription factors in plant adaptive responses to various abiotic stresses. *Front Plant Sci* **12**.
- Qin, T., Tian, Q., Wang, G., and Xiong, L. (2019). LOWER TEMPERATURE 1 enhances ABA responses and plant drought tolerance by modulating the stability and localization of C2-domain ABA-related proteins in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **12**, 1243-1258.
- Qin, Y., Tian, Y., and Liu, X. (2015). A wheat salinity-induced WRKY transcription factor *TaWRKY93* confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **464**, 428-433.
- Rabiei, B., Kordrostami, M., Sabouri, A., and Sabouri, H. (2015). Identification of QTLs for yield related traits in Indica type rice using SSR and AFLP markers. *Poljopr Znan Smotra* **80**, 91-99.
- Ranawake, A. L., Manangkil, O. E., Yoshida, S., Ishii, T., Mori, N., and Nakamura, C. (2014). Mapping QTLs for cold tolerance at germination and the early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol Biotechnol Equip* **28**, 989-998.
- Rativa, A. G. S., Junior, A. T. d. A., Friedrich, D. d. S., Gastmann, R., Lamb, T. I., Silva, A. d. S., Adamski, J. M., Fett, J. P., Ricachenevsky, F. K., and Sperotto, R. A. (2020). Root responses of contrasting rice genotypes to low temperature stress. *J Plant Physiol* **255**, 153307.

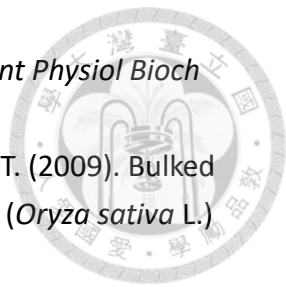
- 
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., and Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant J* **23**, 319-327.
- Sasaki, Y., Takahashi, K., Oono, Y., Seki, M., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Uemura, M. (2008). Characterization of growth-phase-specific responses to cold in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Plant Cell Environ* **31**, 354-365.
- Satrio, R. D., Fendiyanto, M. H., Supena, E. D. J., Suharsono, S., & Miftahudin, M. (2021). Genome-wide SNP discovery, linkage mapping, and analysis of QTL for morpho-physiological traits in rice during vegetative stage under drought stress. *Physiol Mol Biol Plants* **27**(11), 2635-2650.
- Seck PA, Diagne A, Mohanty S, Wopereis MCS (2012) Crops that feed the world 7: Rice. *Food Secur* **4**: 7–24
- Sebastián, D. I., Fernando, F. D., Raúl, D. G., and Gabriela, G. M. (2020). Overexpression of *Arabidopsis* aspartic protease APA1 gene confers drought tolerance. *Plant Sci* **292**, 110406.
- Shakiba, E., Edwards, J. D., Jodari, F., Duke, S. E., Baldo, A. M., Korniliev, P., McCouch, S. R., and Eizenga, G. C. (2017). Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. *Plos one* **12**, e0172133.
- Shirasawa, K., Takabe, T., and Kishitani, S. (2006). Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *AoB Plants* **98**, 565-571.
- Shou, H., Bordallo, P., Fan, J.-B., Yeakley, J. M., Bibikova, M., Sheen, J., and Wang, K. (2004). Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 3298-3303.
- SmoleńAska-Sym, G., and Kacperska, A. (1994). Phosphatidylinositol metabolism in low temperature-affected winter oilseed rape leaves. *Physiol Plant* **91**, 1-8.
- Snell, P., Johnston, D., and Ford, R. (2008). Cold tolerant rice varieties—a matter of need for Australia. *IREC Farmers' Newslett* **177**, 4-5.
- Solis, J., Gutierrez, A., Mangu, V., Sanchez, E., Bedre, R., Linscombe, S., and Baisakh, N. (2017). Genetic mapping of quantitative trait loci for grain yield under drought in rice under controlled greenhouse conditions. *Front Chem* **5**, 129.
- Song, J., Xing, Y., Munir, S., Yu, C., Song, L., Li, H., Wang, T., and Ye, Z. (2016). An ATL78-like RING-H2 finger protein confers abiotic stress tolerance through interacting with RAV2 and CSN5B in tomato. *Front Plant Sci* **7**.

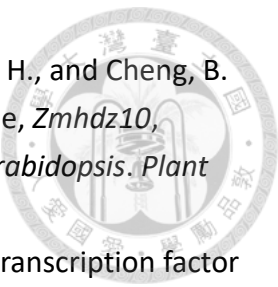
- 
- Stanca, A. M., Crosatti, C., Grossi, M., Lacerenza, N. G., Rizza, F., and Cattivelli, L. (1996). Molecular adaptation of barley to cold and drought conditions. *Euphytica* **92**, 215-219.
- Su, C.-F., Wang, Y.-C., Hsieh, T.-H., Lu, C.-A., Tseng, T.-H., and Yu, S.-M. (2010). A novel *MYBS3*-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant physiol* **153**, 145-158.
- Suh, J., Jeung, J., Lee, J., Choi, Y., Yea, J., Virk, P., Mackill, D., and Jena, K. (2010). Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Theo Appl Genet* **120**, 985-995.
- Suh, J. P., Lee, C. K., Lee, J. H., Kim, J. J., Kim, S. M., Cho, Y. C., Park, S. H., Shin, J. C., Kim, Y. G., and Jena, K. K. (2011). Identification of quantitative trait loci for seedling cold tolerance using RILs derived from a cross between japonica and tropical japonica rice cultivars. *Euphytica* **184**, 101-108.
- Sui, N., Li, M., Zhao, S.-J., Li, F., Liang, H., and Meng, Q.-W. (2007). Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. *Planta* **226**, 1097-1108.
- Sun, X.-L., Yu, Q.-Y., Tang, L.-L., Ji, W., Bai, X., Cai, H., Liu, X.-F., Ding, X.-D., and Zhu, Y.-M. (2013). GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress. *J Plant Physiol* **170**, 505-515.
- Tabkhkar, N., Rabiei, B., Lahiji, H. S., and Chaleshtori, M. H. (2018). Genetic variation and association analysis of the SSR markers linked to the major drought-yield QTLs of rice. *Bioch Genet* **56**, 356-374.
- Takahashi, D., Johnson, K. L., Hao, P., Tuong, T., Erban, A., Sampathkumar, A., Bacic, A., Livingston III, D. P., Kopka, J., Kuroha, T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Zuther, E., and Hincha, D. K. (2021). Cell wall modification by the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase XTH19 influences freezing tolerance after cold and sub-zero acclimation. *Plant Cell Environ* **44**, 915-930.
- Takesawa, T., Ito, M., Kanzaki, H., Kameya, N., and Nakamura, I. (2002). Over-expression of ζ glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Mol Breed* **9**, 93-101.
- Tang, W., Ji, Q., Huang, Y., Jiang, Z., Bao, M., Wang, H., and Lin, R. (2013). FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 and FAR-RED IMPAIRED RESPONSE1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **163**, 857-866.
- Tao, Z., Kou, Y., Liu, H., Li, X., Xiao, J., and Wang, S. (2011). *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *J Exp Bot* **62**, 4863-4874.

- 
- Thomas, S. G., Phillips, A. L., and Hedden, P. (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 4698-4703.
- Vashisht, A. A., and Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **84**, 150-160.
- Venkatesh, J., Kang, M.-Y., Liu, L., Kwon, J.-K., and Kang, B.-C. (2020). F-box family genes, LTSF1 and LTSF2, regulate low-temperature stress tolerance in pepper (*Capsicum chinense*). *Plants* **9**, 1186.
- Wang, C., Wei, Q., Zhang, K., Wang, L., Liu, F., Zhao, L., Tan, Y., Di, C., Yan, H., and Yu, J. (2013). Down-regulation of *OsSPX1* causes high sensitivity to cold and oxidative stresses in rice seedlings. *Plos One* **8**, e81849.
- Wang, D., Liu, J., Li, C., Kang, H., Wang, Y., Tan, X., Liu, M., Deng, Y., Wang, Z., Liu, Y., Zhang, D., Xiao, Y., and Wang, G. L. (2016). Genome-wide association mapping of cold tolerance genes at the seedling stage in rice. *Rice* **9**, 61.
- Wang, G.-L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C., and Nelson, R. J. (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genet* **136**, 1421-1434.
- Wang, H., Ding, Z., Gou, M., Hu, J., Wang, Y., Wang, L., Wang, Y., Di, T., Zhang, X., Hao, X., Wang, X., Yang, Y., and Qian, W. (2021a). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of tea plant autophagy-related genes (*CsARGs*) demonstrates that they play diverse roles during development and under abiotic stress. *BMC Genomics* **22**, 121.
- Wang, H., Dong, Q., Duan, D., Zhao, S., Li, M., van Nocker, S., Ma, F., and Mao, K. (2018a). Comprehensive genomic analysis of the *TYROSINE AMINOTRANSFERASE (TAT)* genes in apple (*Malus domestica*) allows the identification of MdTAT2 conferring tolerance to drought and osmotic stresses in plants. *Plant Physiol Bioch* **133**, 81-91.
- Wang, H., Jin, S., Chen, X., Gen, X., and He, Y. (2012). Target deletion of the AAA ATPase PpCDC48II in *Physcomitrella patens* results in freezing sensitivity after cold acclimation. *Sci China Life Sci* **55**, 150-157.
- Wang, L., Wen, R., Wang, J., Xiang, D., Wang, Q., Zang, Y., Wang, Z., Huang, S., Li, X., Datla, R., Fobert, P. R., Wang, H., Wei, Y., and Xiao, W. (2019). *Arabidopsis* UBC13 differentially regulates two programmed cell death pathways in responses to pathogen and low-temperature stress. *New Phytol* **221**, 919-934.
- Wang, L., Yao, L., Hao, X., Li, N., Qian, W., Yue, C., Ding, C., Zeng, J., Yang, Y., and Wang, X. (2018b). Tea plant *SWEET* transporters: expression profiling, sugar transport, and the involvement of *CsSWEET16* in modifying cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **96**, 577-592.

- 
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., and Chu, C. (2008). Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol* **67**, 589-602.
- Wang, Y.-J., Zhang, Z.-G., He, X.-J., Zhou, H.-L., Wen, Y.-X., Dai, J.-X., Zhang, J.-S., and Chen, S.-Y. (2003). A rice transcription factor *OsbHLH1* is involved in cold stress response. *Theo Appl Genet* **107**, 1402-1409.
- Wang, Z.-Y., Gehring, C., Zhu, J., Li, F.-M., Zhu, J.-K., and Xiong, L. (2014). The *Arabidopsis* *Vacuolar Sorting Receptor1* is required for osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol* **167**, 137-152.
- Wang, Z., Wang, F., Zhou, R., Wang, J., and Zhang, H. (2011). Identification of quantitative trait loci for cold tolerance during the germination and seedling stages in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **181**(3), 405-413.
- Wang, Z., Wong, D. C. J., Wang, Y., Xu, G., Ren, C., Liu, Y., Kuang, Y., Fan, P., Li, S., Xin, H., and Liang, Z. (2021b). GRAS-domain transcription factor *PAT1* regulates jasmonic acid biosynthesis in grape cold stress response. *Plant Physiol* **186**, 1660-1678.
- Wang, Z. F., Wang, J. F., Wang, F. H., Bao, Y. M., Wu, Y. Y., and Zhang, H. S. (2009). Genetic control of germination ability under cold stress in rice. *Rice Sci* **16**(3), 173-180.
- Weather Spark (2022) from: <https://tw.weatherspark.com/>
- Xiang, Y., Huang, Y., and Xiong, L. (2007). Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol* **144**, 1416-1428.
- Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H., and Xiong, L. (2008). Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* **148**, 1938-1952.
- Xie, G., Kato, H., and Imai, R. (2012). Biochemical identification of the *OsMKK6–OsMPK3* signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Bioch J* **443**, 95-102.
- Xiong, L., and Yang, Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* **15**, 745-759.
- Xu, F.-Q., and Xue, H.-W. (2019). The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant Cell Environ* **42**, 2931-2944.
- Yamazaki, T., Kawamura, Y., Minami, A., and Uemura, M. (2008). Calcium-dependent freezing tolerance in *Arabidopsis* involves membrane resealing via synaptotagmin *SYT1*. *The Plant Cell* **20**, 3389-3404.
- Yamori, W., Sakata, N., Suzuki, Y., Shikanai, T., and Makino, A. (2011). Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD (P) H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *The Plant J* **68**, 966-976.

- 
- Yan, J., Wang, J., Li, Q., Hwang, J. R., Patterson, C., and Zhang, H. (2003). AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 861-869.
- Yan, Y.-S., Chen, X.-Y., Yang, K., Sun, Z.-X., Fu, Y.-P., Zhang, Y.-M., and Fang, R.-X. (2011). Overexpression of an F-box protein gene reduces abiotic stress tolerance and promotes root growth in rice. *Mol Plant* **4**, 190-197.
- Yang, A., Dai, X., and Zhang, W.-H. (2012). A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* **63**, 2541-2556.
- Yang, C., Li, D., Mao, D., Liu, X., Ji, C., Li, X., Zhao, X., Cheng, Z., Chen, C., and Zhu, L. (2013a). Overexpression of micro RNA 319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ* **36**, 2207-2218.
- Yang, L., Liu, H., Lei, L., Zhao, H., Wang, J., Li, N., Sun, J., Zheng, H., and Zou, D. (2018). Identification of QTLs controlling low-temperature germinability and cold tolerance at the seedling stage in rice (*Oryza Sativa* L.). *Euphytica* **214**, 1-17.
- Yang, W., Guo, Z., Huang, C., Duan, L., Chen, G., Jiang, N., Fang, W., Feng, H., Xie, W., and Lian, X. (2014). Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. *Nature Commun* **5**, 1-9.
- Yang, Y., Zhang, X., Su, Y., Zou, J., Wang, Z., Xu, L., and Que, Y. (2017). miRNA alteration is an important mechanism in sugarcane response to low-temperature environment. *BMC Genomics* **18**, 833.
- Yang, Z., Huang, D., Tang, W., Zheng, Y., Liang, K., Cutler, A. J., and Wu, W. (2013b). Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. *Plos One* **8**, e68433.
- Yokotani, N., Sato, Y., Tanabe, S., Chujo, T., Shimizu, T., Okada, K., Yamane, H., Shimono, M., Sugano, S., Takatsuji, H., Kaku, H., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2013). *WRKY76* is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *J Exp Bot* **64**, 5085-5097.
- Yu, S., Li, M., Xiao, Y., Huang, D., and Chen, D. (2018). Mapping QTLs for cold tolerance at seedling stage using an *Oryza sativa* × *O. rufipogon* backcross inbred line population. *Czech J Genet Plant Breed* **54**, 59-64.
- Yu, Y., Yu, J., Wang, Q., Wang, J., Zhao, G., Wu, H., Zhu, Y., Chu, C., and Fang, J. (2021). Overexpression of the rice *ORANGE* gene *OsOR* negatively regulates carotenoid accumulation, leads to higher tiller numbers and decreases stress tolerance in Nipponbare rice. *Plant Sci* **310**, 110962.
- Zhang, C.-L., Mao, K., Zhou, L.-J., Wang, G.-L., Zhang, Y.-L., Li, Y.-Y., and Hao, Y.-J. (2018a). Genome-wide identification and characterization of apple long-chain Acyl-CoA

- 
- synthetases and expression analysis under different stresses. *Plant Physiol Bioch* **132**, 320-332.
- Zhang, G.-L., Chen, L.-Y., Xiao, G.-Y., Xiao, Y.-H., Chen, X.-B., and Zhang, S.-T. (2009). Bulk segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. *Agri Sci China* **8**, 482-487.
- Zhang, H., Li, A., Zhang, Z., Huang, Z., Lu, P., Zhang, D., Liu, X., Zhang, Z.-F., and Huang, R. (2016). Ethylene response factor *TERF1*, regulated by *ETHYLENE-INSENSITIVE3*-like factors, functions in reactive oxygen species (ROS) scavenging in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Sci Rep* **6**, 29948.
- Zhang, H., Wu, T., Li, Z., Huang, K., Kim, N.-E., Ma, Z., Kwon, S.-W., Jiang, W., and Du, X. (2021). *OsGATA16*, a GATA transcription factor, confers cold tolerance by repressing *OsWRKY45-1* at the seedling stage in rice. *Rice* **14**, 42.
- Zhang, J., Li, J., Wang, X., and Chen, J. (2011). *OVP1*, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiol Bioch* **49**, 33-38.
- Zhang, M., Ye, J., Xu, Q., Feng, Y., Yuan, X., Yu, H., Wang, Y., and Yang, Y. (2018b). Genome-wide association study of cold tolerance of Chinese indica rice varieties at the bud burst stage. *Plant Cell Rep* **37**, 529-539.
- Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., Hong, Y., and Wang, Z. (2014a). Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice* **7**, 1-12.
- Zhang, Q., Jiang, N., Wang, G.-L., Hong, Y., and Wang, Z. (2013). Advances in understanding cold sensing and the cold-responsive network in rice. *Adv Crop Sci Tech* **1**, 104.
- Zhang, S., Zheng, J., Liu, B., Peng, S., Leung, H., Zhao, J., Wang, X., Yang, T., and Huang, Z. (2014b). Identification of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using two distinct methods of cold treatment. *Euphytica* **195**, 95-104.
- Zhang, X., Liu, S., and Takano, T. (2008). Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, *AtCYSa* and *AtCYSb*, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol Biol* **68**, 131-143.
- Zhang, Z., Deng, Y., Tan, J., Hu, S., Yu, J., and Xue, Q. (2007). A genome-wide microsatellite polymorphism database for the indica and japonica rice. *DNA Res* **14**, 37-45.
- Zhang, Z., Li, S., Wei, L., Wei, C., and Zhu, Y. (2005). A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* **168**, 527-534.
- Zhao, J., Wang, S., Qin, J., Sun, C., and Liu, F. (2020). The lipid transfer protein *OsLTPL159* is involved in cold tolerance at the early seedling stage in rice. *Plant Biotech J* **18**, 756-769.

- 
- Zhao, Y., Ma, Q., Jin, X., Peng, X., Liu, J., Deng, L., Yan, H., Sheng, L., Jiang, H., and Cheng, B. (2014). A novel maize homeodomain–leucine zipper (HD-Zip) gene, *Zmhdz10*, positively regulates drought and salt tolerance in both rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **55**, 1142-1156.
- Zheng, X., Chen, B., Lu, G., and Han, B. (2009). Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 985-989.
- Zheng, Y., Luo, L., Wei, J., Chen, Q., Yang, Y., Hu, X., and Kong, X. (2018). The glutamate receptors *AtGLR1.2* and *AtGLR1.3* increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **506**, 895-900.
- Zhou, X., Cao, K., Zhang, Z., Tan, Y., Fan, H., and Xu, H. (2021). TMT-based proteomic profiling reveals the molecular mechanism in the cold tolerance of *Rhododendron Aureum* Georgi. *Res Sq* (DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-668077/v1>)



附錄

附表一、*qLTT-2*、*qLTT-5*、*qLTT-6* 及 *qLTT-7* 區間內植物耐寒反應相關轉錄體列表

Table S1. List of plant cold tolerance relating transcriptomes in *qLTT-2*, *qLTT-5*, *qLTT-6*, and *qLTT-7* intervals

Transcriptome	Description	Function	Transcriptome	Description	Function
<i>qLTT-2</i>					
LOC4328967	expansin-A14-like	細胞構造	LOC107276277	calcineurin B-like protein 7	水稻環境逆境
LOC107276428	expansin-A24-like	細胞構造	LOC107276173	calcineurin B-like protein 8	水稻環境逆境
LOC107276661	expansin-A23	細胞構造	LOC4329062	GDSL esterase/lipase At1g71691	滲透調節
LOC107276660	expansin-A23	細胞構造	LOC9272069	GDSL esterase/lipase At5g22810	滲透調節
LOC4328971	expansin-A22-like	細胞構造	LOC4329063	GDSL esterase/lipase At5g55050	滲透調節
LOC4328975	dynein light chain LC6, flagellar outer arm	滲透調節	LOC4329065	factor of DNA methylation 1	轉錄
LOC4328985	transcription factor MYB64	轉錄因子	LOC4329066	E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5	蛋白質降解
LOC4328990	disease resistance protein RGA5-like	防禦反應	LOC112937882	zinc finger protein ZAT3-like	Zinc finger
LOC4328991	uridine kinase-like protein 3	代謝	LOC9266581	WD repeat-containing protein 26 homolog	逆境
LOC4328993	TOM1-like protein 9	發育	LOC4329076	protein PAT1 homolog	轉錄因子
LOC4328996	RNA-binding protein Raly	轉錄	LOC9270665	protein PAT1 homolog	轉錄因子
LOC9268112	receptor-like protein EIX2	防禦反應	LOC4329079	cell differentiation protein rcd1	細胞分化

LOC4329007	probable tocopherol cyclase, chloroplastic	葉綠體	LOC112938017	small nucleolar RNA Z247	轉錄
LOC4329008	transcription factor bHLH133	轉錄	LOC107280155	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	ABA
LOC4329010	probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710	<i>OsLRR2</i>	LOC4329084	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	ABA
LOC107275555	cysteine proteinase inhibitor 1	ABA	LOC107278249	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	ABA
LOC112938038	small nucleolar RNA U61	轉錄	LOC4329087	protein IQ-DOMAIN 1	防禦反應
LOC112938040	small nucleolar RNA snoR14	低溫反應	LOC107276063	disease resistance protein Pik-2	防禦反應
LOC4329018	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 26	細胞構造	LOC4329092	zinc finger CCCH domain-containing protein 15-like	Zinc finger
LOC4329019	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 26	細胞構造	LOC4329093	bidirectional sugar transporter SWEET4-like	滲透調節
LOC4329021	probable lactoylglutathione lyase, chloroplastic	葉綠體	LOC4329094	zinc finger MYM-type protein 1	Zinc finger
LOC4329023	protein phosphatase 2C and cyclic nucleotide-binding/kinase domain-containing protein	逆境	LOC4329095	probable pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH5	轉錄



LOC9267245	F-box protein At3g58530	ABA	LOC107275860	CCR4-NOT transcription complex subunit 9	<i>OsCAF1B</i>
LOC4329024	disease resistance protein RGA2	防禦反應	LOC4329096	disease resistance protein RGA5-like	防禦反應
LOC4329026	putative disease resistance protein RGA1	防禦反應	LOC4329098	tyrosine aminotransferase	酪胺酸 生理代謝
LOC4329027	putative disease resistance protein RGA1	防禦反應	LOC4329105	glycine-rich cell wall structural protein 1	細胞構造
LOC4329029	putative disease resistance protein RGA4	防禦反應	LOC107278170	probable serine/threonine-protein kinase At1g09600	蛋白質代謝
LOC4329031	ABC transporter E family member 2	滲透調節	LOC4329106	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At5g43820	低溫反應
LOC4329032	LRR receptor kinase SERK2-like	轉錄因子	LOC4329107	protein DEHYDRATION-INDUCED 19 homolog 4-like	滲透調節
LOC4329033	protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5	ABA	LOC4329108	putative disease resistance protein RGA4	防禦反應
LOC4329034	60S ribosomal protein L27-3	轉錄	LOC4329116	dnaJ homolog subfamily B member 4	防禦反應
LOC4329035	nucleolin	逆境反應	LOC107277623	putative disease resistance protein RGA1	防禦反應
LOC4329036	salt stress root protein RS1-like	逆境相關	LOC4329118	WD repeat-containing protein ATCSA-1	逆境
LOC107279944	serine/threonine-protein kinase RHS3	磷酸化	LOC107277613	putative disease resistance protein RGA4	防禦反應



LOC4329037	putative elongation factor TypA-like SVR3	細胞構造	LOC4329121	fasciclin-like arabinogalactan protein 6	生長發育
LOC4329038	GDSL esterase/lipase At4g10955	滲透調節	LOC9271858	fasciclin-like arabinogalactan protein 13	生長發育
LOC107278236	non-specific lipid transfer protein-like 1	細胞構造	LOC107276493	BTB/POZ and MATH domain- containing protein 2-like	逆境相關
LOC4329040	disease resistance protein RGA5-like	防禦反應	LOC107276162	BTB/POZ and MATH domain- containing protein 2-like	逆境相關
LOC4329047	ABC transporter C family member 3	滲透調節	LOC107276058	BTB/POZ and MATH domain- containing protein 1	逆境相關
LOC4329048	BURP domain-containing protein 4-like	<i>SNAC2</i>	LOC4329137	C2 domain-containing protein At1g53590	ABA
LOC9272039	ABC transporter C family member 3-like	滲透調節	LOC9269067	vacuolar cation/proton exchanger 1c- like	滲透調節
LOC4329050	BURP domain-containing protein 4-like	<i>SNAC2</i>	LOC4329142	aspartyl protease family protein 2	ABA
LOC4329053	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At5g08490	低溫反應	LOC4329143	oligosaccharyltransferase complex subunit ostc	細胞分裂
LOC4329057	ribosomal RNA small subunit methyltransferase nep-1	轉錄	LOC4329144	transcription factor bHLH144	轉錄因子
LOC4329058	phosphatidylinositol 4-kinase gamma 4	逆境反應	LOC4329145	F-box/kelch-repeat protein OR23	ABA
LOC9271527	GDSL esterase/lipase 7	滲透調節	LOC4329151	putative F-box/LRR-repeat protein 23	ABA



LOC4329157	pre-mRNA-splicing factor CWC22	轉錄	LOC4329153	putative F-box/LRR-repeat protein 23	ABA
LOC4329158	ABC transporter G family member 40	滲透調節			
<i>qLTT-5</i>					
LOC9271541	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9-like	粒線體	LOC112939172	small nucleolar RNA snoR109	轉錄
LOC4337596	metallothionein-like protein 2C	滲透運輸	LOC112939124	small nucleolar RNA snoR118	轉錄
LOC107276386	putative protein phosphatase 2C 46	磷酸化	LOC112939147	small nucleolar RNA R66	轉錄
LOC4337598	E3 ubiquitin-protein ligase XB3-like	泛素	LOC4337836	E3 ubiquitin-protein ligase SINA-like 10	泛素
LOC4337599	dof zinc finger protein DOF3.6	Zinc Finger	LOC107277097	probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 23	泛素
LOC4337600	cysteine-rich repeat secretory protein 55	ABA	LOC4337838	factor of DNA methylation 1	甲基化
LOC4337601	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g35030, mitochondrial	低溫反應	LOC4337840	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g13600	低溫反應
LOC4337605	actin-depolymerizing factor 7-like	滲透運輸	LOC4337844	E3 ubiquitin-protein ligase RFI2	泛素
LOC4337607	probable histone H2A.6	轉錄	LOC4337845	kinesin-like protein KIN-13A	低溫訊號



LOC4337609	zinc finger protein ZAT12	Zinc Finger	LOC4337847	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 28	轉錄
LOC4337610	RNA-binding protein 34	轉錄	LOC4337848	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP-a	脂肪酸
LOC9271771	transcription factor MYB48	轉錄因子	LOC112939117	small nucleolar RNA snoR53Y	轉錄
LOC4337622	probable glutathione S-transferase DHAR1, cytosolic	氧化還原	LOC112939159	small nucleolar RNA SNORD29	轉錄
LOC107278455	putative F-box protein At2g02030	ABA	LOC112939148	small nucleolar RNA SNORD29	轉錄
LOC4337624	putative F-box/kelch-repeat protein At1g12870	ABA	LOC4337850	probable ethylene response sensor 2	乙烯
LOC107277971	acidic proline-rich protein PRP25	滲透運輸	LOC4337852	GATA transcription factor 23	轉錄
LOC9266232	E3 UFM1-protein ligase 1 homolog	泛素	LOC4337853	importin subunit alpha-1b-like	滲透運輸
LOC9268593	kinesin-like protein KIN-5A	低溫訊號	LOC4337860	dnaJ protein ERDJ3B-like	低溫反應
LOC4337643	ABC transporter G family member 16	滲透運輸	LOC4337863	serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3	磷酸化
LOC4337645	ABC transporter G family member 16	滲透運輸	LOC4337874	gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	GA
LOC4337647	calcium-transporting ATPase 4, endoplasmic reticulum-type	滲透運輸	LOC4337876	E3 ubiquitin-protein ligase UPL6	泛素
LOC4337653	50S ribosomal protein L10, chloroplastic	轉錄	LOC4337878	GDSL esterase/lipase At1g09390	生長分化



LOC4337654	AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3	乙烯	LOC4337879	GDSL esterase/lipase At1g09390	生長分化
LOC4337658	E3 ubiquitin-protein ligase UPL4	泛素	LOC107275915	fasciclin-like arabinogalactan protein 8	生長發育
LOC4337661	low temperature-induced protein lt101.2	低溫反應	LOC4337883	ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-2-like	泛素
LOC4337662	tetraspanin-3	低溫反應	LOC4337884	non-specific lipid-transfer protein	脂質
LOC107278669	LOB domain-containing protein 1	轉錄修飾	LOC4337892	peroxidase 5	氧化還原
LOC4337665	probable glucuronosyltransferase Os05g0123100	逆境	LOC4337896	receptor-like protein kinase HERK 1	防禦反應
LOC4337666	protein IQ-DOMAIN 1	SA	LOC4337901	fasciclin-like arabinogalactan protein 11	生長發育
LOC4337672	E3 SUMO-protein ligase SIZ1-like	泛素	LOC4337902	probable E3 ubiquitin-protein ligase RHG1A	泛素
LOC4337673	L-type lectin-domain containing receptor kinase VIII.2	ABA	LOC107277361	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	滲透運輸
LOC4337675	probable serine/threonine-protein kinase PBL26	磷酸化	LOC4337904	acyl-coenzyme A oxidase 4, peroxisomal	低溫反應
LOC4337679	tetraspanin-6	低溫反應	LOC4337905	putative transcription factor bHLH107	轉錄



LOC9266041	putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3	磷酸化	LOC9269942	E3 ubiquitin-protein ligase ATL41	泛素
LOC9268635	dnaJ homolog subfamily B member 1	低溫反應	LOC4337908	zinc transporter 6-like	Zinc Finger
LOC4337689	probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase At5g05600	滲透運輸	LOC107280904	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM17-2-like	粒線體
LOC4337692	zinc finger CCCH domain-containing protein 33-like	Zinc Finger	LOC9268007	LOB domain-containing protein 15	轉錄修飾
LOC107280899	ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 1 protein	乙烯	LOC4337915	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	滲透運輸
LOC9270274	probable WRKY transcription factor 69	轉錄	LOC4337918	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	滲透運輸
LOC4337703	RNA polymerase II-associated protein 3	轉錄	LOC4337919	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	滲透運輸
LOC4337704	cysteine-rich receptor-like protein kinase 2	ABA	LOC107281036	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130	滲透運輸
LOC4337711	beta-carotene isomerase D27, chloroplastic	葉綠體	LOC4337928	60S ribosomal protein L10-2-like	轉錄



LOC9267549	beta-carotene isomerase D27, chloroplastic-like	葉綠體	LOC4337929	autophagy-related protein 18d	細胞代謝
LOC4337713	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g48810	低溫反應	LOC4337932	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	磷酸化
LOC4337714	long chain acyl-CoA synthetase 1	脂肪酸	LOC4337936	universal stress protein PHOS32	逆境
LOC4337718	transcription factor MYB2-like	轉錄因子	LOC4337937	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1	磷酸化
LOC9270563	GDSL esterase/lipase At1g09390	生長分化	LOC4337942	phospholipase D alpha 1-like	脂肪酸
LOC4337723	probable protein phosphatase 2C 47	磷酸化	LOC4337945	adenine nucleotide transporter BT1, chloroplastic/mitochondrial	葉綠體/粒線體
LOC4337725	peroxidase 2	氧化還原	LOC107281092	putative F-box protein At3g52320	ABA
LOC4337726	peroxidase 2	氧化還原	LOC4337950	F-box protein At5g07610	ABA
LOC4337727	peroxidase 2	氧化還原	LOC112939128	small nucleolar RNA R71	轉錄
LOC4337728	peroxidase 2	氧化還原	LOC9270454	F-box protein At5g07610-like	ABA
LOC4337730	peroxidase 5	氧化還原	LOC112939168	small nucleolar RNA snoR60	轉錄
LOC4337731	peroxidase 5	氧化還原	LOC112939169	small nucleolar RNA snoR60	轉錄
LOC4337732	peroxidase 5	氧化還原	LOC4337958	probable cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming]	細胞構造
LOC4337733	S-adenosylmethionine synthase 1-like	ABA/氧化還原	LOC4337959	zinc finger CCCH domain-containing protein 34-like	Zinc Finger
LOC112939126	small nucleolar RNA U3	轉錄	LOC4337963	putative boron transporter 5	滲透運輸



LOC4337736	CBL-interacting protein kinase 17-like	ABA 鈣梨子	LOC4337964	F-box protein At5g07610	ABA
LOC4337739	acyl transferase 4-like	脂肪酸	LOC4337966	F-box protein At5g07610	ABA
LOC4337742	ABC transporter B family member 21	滲透運輸	LOC4337968	gibberellin 3-beta-dioxygenase 2-2	GA
LOC107276141	probable WRKY transcription factor 47	轉錄	LOC4337970	serine/threonine protein phosphatase 2A 57 kDa regulatory subunit B' kappa isoform	磷酸化
LOC4337749	chitinase 10-like	防禦	LOC4337972	pre-mRNA splicing factor SR-like 1	轉錄
LOC4337753	F-box protein At5g07610	ABA	LOC4337973	E3 ubiquitin-protein ligase At1g63170	泛素
LOC4337754	putative F-box protein At3g10240	ABA	LOC4337975	acyl transferase 7-like	脂肪酸
LOC4337756	transcription factor MYB61	轉錄因子	LOC4337976	stress response protein NST1	逆境
LOC4337757	RNA-binding protein Y14A-like	轉錄	LOC4337982	phosphatidylinositol 3-kinase, root isoform	滲透運輸
LOC107275839	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 4	甲基化	LOC4337984	heat shock 70 kDa protein 15	逆境
LOC9267958	mitogen-activated protein kinase 14-like	轉錄	LOC9270086	60S ribosomal protein L18a-like protein	轉錄
LOC4337778	salt stress-induced protein-like	逆境	LOC112939145	small nucleolar RNA Z159/U59	轉錄
LOC4337784	probable ATP-dependent DNA helicase CHR12	轉錄	LOC4337993	ubiquitin-conjugating enzyme E2 2	泛素
LOC4337785	serine/threonine-protein phosphatase BSL1 homolog	磷酸化	LOC4337998	probable WRKY transcription factor 50	轉錄



LOC4337790	E3 ubiquitin-protein ligase SIS3	泛素	LOC4337999	MLO-like protein 9	ABA
LOC4337793	VIN3-like protein 1	春化	LOC4338003	pseudouridine kinase	葉綠體
LOC4337794	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g35850, mitochondrial	低溫反應	LOC4338005	30S ribosomal protein S31, chloroplastic	轉錄
LOC112939496	small nucleolar RNA Z247	轉錄	LOC4338006	pseudo histidine-containing phosphotransfer protein 2-like	耐寒訊號
LOC107276351	probable calcium-binding protein CML22	鈣	LOC4338007	NADP-dependent malic enzyme, chloroplastic-like	葉綠體
LOC4337804	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g05340	低溫反應	LOC4338010	hexokinase-7-like	糖解
LOC4337814	probable glutathione S-transferase GSTF1	氧化還原	LOC4338011	protein IQ-DOMAIN 14	SA
LOC4337816	proline-rich protein 36	細胞壁	LOC107280912	vegetative storage protein 1-like	儲存蛋白
LOC4337817	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	乙烯	LOC112939163	small nucleolar RNA Z247	轉錄
LOC4337818	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	乙烯	LOC4338032	NAC domain-containing protein 75	轉錄
LOC4337819	protein O-glucosyltransferase 1	低溫反應	LOC107281070	zinc finger MYM-type protein 1-like	Zinc Finger
LOC112939116	small nucleolar RNA snoR104	轉錄	LOC4338037	zinc finger CCCH domain-containing protein 35-like	Zinc Finger
LOC4337825	probable chromatin-remodeling complex ATPase chain	轉錄	LOC4338039	transcription factor MYBS3-like	轉錄因子



LOC4337828	ATP-dependent DNA helicase Q-like SIM	轉錄	LOC4338040	ABC transporter C family member 8	滲透運輸
LOC107280902	zinc finger protein 4-like	Zinc Finger	LOC107275928	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7	乙烯
LOC112939125	small nucleolar RNA snoR118	轉錄	LOC112938980	germin-like protein 5-1	逆境
LOC112939173	small nucleolar RNA snoR109	轉錄	LOC4338047	IQ domain-containing protein IQM1	SA
LOC112939123	small nucleolar RNA snoR118	轉錄	LOC4338051	zinc transporter 7-like	Zinc Finger
LOC112939146	small nucleolar RNA R66	轉錄	LOC112939157	small nucleolar RNA Z247	轉錄
<i>qLTT-6</i>					
LOC112939496	small nucleolar RNA Z247	轉錄	LOC4342107	GDSL esterase/lipase At5g55050	生長分化
LOC9272521	ABSCISIC ACID- INSENSITIVE 5-like protein 2	ABA	LOC4342108	GDSL esterase/lipase At5g55050	生長分化
LOC9266154	ABSCISIC ACID- INSENSITIVE 5-like protein 2	ABA	LOC4341860	polyubiquitin	泛素
LOC4342096	ABSCISIC ACID- INSENSITIVE 5-like protein 2	ABA	LOC4342059	CDPK-related kinase 3	鈣
LOC4342079	protein EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7, chloroplastic	葉綠體	LOC4341932	peroxidase 16	氧化還原
LOC4342097	protein FREE1	低溫反應	LOC4341933	peroxidase 16	氧化還原
LOC9272377	choline monooxygenase, chloroplastic	葉綠體	LOC4341935	peroxidase 16	氧化還原



LOC4341917	probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g57670	滲透運輸	LOC4341861	peroxidase 3	氧化還原
LOC4342103	serine/threonine-protein kinase ATR-like	滲透運輸	LOC4341934	peroxidase 45	氧化還原
LOC4341982	probable serine/threonine- protein kinase PBL17	滲透運輸	LOC4342003	non-specific lipid-transfer protein 2P	脂質
LOC4342066	probable serine/threonine- protein kinase PBL19	滲透運輸	LOC4341969	60S acidic ribosomal protein P3-like	轉錄
LOC4342105	serine/threonine-protein kinase STY46	滲透運輸	LOC4341987	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 homolog	泛素
LOC4342126	probable serine/threonine- protein kinase PIX13	滲透運輸	LOC4341960	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A	泛素
LOC107276211	homeobox-leucine zipper protein HOX18	ABA	LOC4341941	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23	細胞構造
LOC4342089	homeobox-leucine zipper protein HOX29-like	ABA	LOC4341940	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22	細胞構造
LOC9270284	homeobox-leucine zipper protein HOX29-like	ABA	LOC4341942	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24	細胞構造



LOC9271485	homeobox-leucine zipper protein HOX29-like	ABA	LOC4341944	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25	細胞構造
LOC107277851	homeobox-leucine zipper protein HOX29-like	ABA	LOC9267681	glycosyltransferase family 64 protein C4	糖解
LOC4341951	protein ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2	防禦	LOC4341856	probable glycosyltransferase At5g20260	糖解
LOC4342015	putative disease resistance protein RGA1	防禦	LOC4341953	GATA transcription factor 20-like	轉錄
LOC9271614	disease resistance protein RPM1	防禦	LOC4341907	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6	IAA
LOC107278751	disease resistance protein RPM1-like	防禦	LOC9267986	novel plant SNARE 11	滲透運輸
LOC4341916	putative disease resistance protein RGA3	防禦	LOC4341869	50S ribosomal protein L24, chloroplastic	葉綠體
LOC107277356	putative disease resistance protein RGA3	防禦	LOC4341939	RING-H2 finger protein ATL43	逆境
LOC9266824	putative disease resistance protein RGA3	防禦	LOC4342024	WAT1-related protein At3g45870	逆境
LOC4341880	synaptotagmin-3	鈣	LOC4342115	chitinase 1-like	防禦
LOC4342124	catalase isozyme B-like	氧化還原	LOC4342114	chitinase 3-like	防禦
LOC4342122	U-box domain-containing protein 15	泛素	LOC4341855	cytochrome P450 77A3	光合作用



LOC4342078	basic leucine zipper 19	轉錄因子	LOC4342002	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g03580	低溫反應
LOC9272421	protein FAR1-RELATED SEQUENCE 9	光合作用	LOC4341929	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g61360	低溫反應
LOC4341920	cytoplasmic 60S subunit biogenesis factor REI1 homolog 1	細胞構造	LOC4341962	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g14820-like	低溫反應
LOC107277228	cytoplasmic 60S subunit biogenesis factor REI1 homolog 1	細胞構造	LOC112936035	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g21065-like	低溫反應
LOC112939458	small nucleolar RNA snoR128	轉錄	LOC9268482	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g42310, chloroplastic	低溫反應
LOC112939450	small nucleolar RNA snoR20a	轉錄	LOC4341926	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g44230	低溫反應
LOC112939453	small nucleolar RNA snoR80	轉錄	LOC107275629	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g48910	低溫反應
LOC112939499	small nucleolar RNA Z157/R69/R10	轉錄	LOC4341903	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g65560	低溫反應
LOC112939498	small nucleolar RNA Z157/R69/R10	轉錄	LOC4342039	F-box/kelch-repeat protein SKIP25	ABA
LOC112939488	small nucleolar RNA R38	轉錄	LOC4342081	RNA pseudouridine synthase 2, chloroplastic-like	葉綠體
LOC4342019	type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B-like	轉錄	LOC4341905	ethylene-responsive transcription factor 3	乙烯



LOC4342082	NEP1-interacting protein-like 1	ABA	LOC4342017	mitogen-activated protein kinase 12-like	生長分化
LOC4341897	RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3	轉錄	LOC4341956	mitogen-activated protein kinase 4-like	生長分化
LOC9271931	transcription factor bHLH93	轉錄因子	LOC107281441	nucleolin-like	細胞構造
LOC4341913	receptor-like protein 2	防禦	LOC4341945	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 35B	逆境
LOC4341994	zinc finger CCCH domain-containing protein 46-like	Zinc Finger	LOC4342116	NAC domain-containing protein 22-like	轉錄
LOC4342123	zinc finger protein ZAT2	Zinc Finger	LOC4341854	glutamate receptor 3.4	JA
LOC4341865	zinc finger CCCH domain-containing protein 13-like	Zinc Finger	LOC4342040	21 kDa protein	ABA
LOC107278272	acyl transferase 15-like	脂肪酸	LOC4342086	expansin-A29-like	細胞構造
LOC107276335	vegetative cell wall protein gp1	細胞構造	LOC4342109	expansin-like A4	細胞構造
LOC4341900	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10	ABA	LOC4341868	putative anthocyanidin reductase	氧化還原
LOC4341898	cysteine-rich receptor-like protein kinase 5	ABA	LOC4341908	probable calcium-binding protein CML29	鈣
LOC4342050	B-box zinc finger protein 20	Zinc Finger	LOC4342047	MADS-box transcription factor 16-like	轉錄
LOC4341948	AAA-ATPase At3g28580	細胞代謝	LOC4342085	aspartyl protease family protein 1	逆境
LOC4341947	AAA-ATPase At3g50940	細胞代謝	LOC4341949	probable protein phosphatase 2C 59	磷酸化
LOC112939464	U6 spliceosomal RNA	逆境	LOC4342084	probable protein phosphatase 2C 60	磷酸化
LOC4341871	calcium-binding protein KRP1	鈣	LOC4341858	early nodulin-like protein 1	根發育



LOC9266375	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	鈣	LOC4341972	auxin-induced protein 10A5	IAA
LOC4342125	probable galacturonosyltransferase 3	糖解	LOC4342027	F-box protein SKIP31	ABA
LOC4341895	probable glucuronosyltransferase Os06g0687900	糖解	LOC112939371	putative F-box/LRR-repeat protein At3g18150	ABA
LOC4341870	beta-glucosidase 25-like	糖解	LOC4342053	putative F-box/LRR-repeat protein At3g59230	ABA
			LOC4342044	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-1	泛素
<i>qLTT-7</i>					
LOC4344217	sodium/hydrogen exchanger 2	滲透運輸	LOC4344146	beta-glucosidase 26-like	糖解
LOC4344265	60S ribosomal protein L18-3	轉錄	LOC4344225	GDSL esterase/lipase At2g23540	水解
LOC4344255	universal stress protein PHOS34	逆境	LOC4344141	protein HUA2-LIKE 3	氧化還原
LOC9270916	protein SRC2	逆境	LOC4344243	flowering-promoting factor 1-like protein 5	生長分化
LOC4344182	protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15	滲透運輸	LOC4344282	cationic peroxidase 1	氧化還原
LOC4344218	tubby-like F-box protein 11	ABA	LOC4344277	peroxidase 2-like	氧化還原
LOC4344299	serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19	滲透運輸	LOC4344276	peroxidase 70	氧化還原



LOC4344222	probable serine/threonine-protein kinase At1g54610	滲透運輸	LOC4344109	BSD domain-containing protein 1-like	生長分化
LOC4344229	probable serine/threonine-protein kinase PBL7	滲透運輸	LOC4344194	RNA-binding protein BRN1	轉錄
LOC107281649	serine/threonine-protein phosphatase 7 long form homolog	滲透運輸	LOC4344166	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 6	磷酸化
LOC112939688	homeobox-leucine zipper protein ROC8-like	ABA	LOC4344143	aspartate and glycine-rich protein	逆境
LOC4344298	protein ENHANCED DISEASE RESISTANCE 4	防禦	LOC4344147	probable glycosyltransferase STELLO1	糖解
LOC4344116	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	轉錄	LOC4344261	60S ribosomal protein L22-2	轉錄
LOC4344305	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 33A	轉錄	LOC4344184	E3 ubiquitin-protein ligase AIRP2	泛素
LOC4344292	transcription factor RF2b-like	轉錄	LOC4344172	E3 ubiquitin-protein ligase DIS1-like	泛素
LOC4344294	vacuolar-sorting receptor 1	滲透運輸	LOC4344297	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	泛素
LOC107276052	annexin D3	細胞構造	LOC4344112	E3 ubiquitin-protein ligase SP1	泛素
LOC112939772	small nucleolar RNA SNORD34	轉錄	LOC4344254	probable E3 ubiquitin-protein ligase BAH1-like 2	泛素
LOC107281654	autophagy-related protein 18a	細胞代謝	LOC4344139	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 1	逆境
LOC112939689	autophagy-related protein 18a-like	細胞代謝	LOC4344228	BTB/POZ domain-containing protein At3g05675	逆境



LOC4344178	WD repeat-containing protein 55	逆境	LOC4344303	cytochrome P450 714B1	光合作用
LOC4344312	zinc finger CCCH domain-containing protein 53-like	Zinc Finger	LOC4344089	probable cytochrome P450 313a3	光合作用
LOC4344220	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 13	Zinc Finger	LOC4344107	cytochrome P450 734A5-like	光合作用
LOC4344226	zinc finger CCCH domain-containing protein 10-like	Zinc Finger	LOC4344187	pentatricopeptide repeat-containing protein At1g01970	低溫反應
LOC107277921	cysteine-rich receptor-like protein kinase 15	ABA	LOC4344190	putative pentatricopeptide repeat-containing protein At5g40405	低溫反應
LOC4344285	CBL-interacting protein kinase 29-like	鈣	LOC4344245	pentatricopeptide repeat-containing protein At2g32630	低溫反應
LOC4344287	CBL-interacting protein kinase 2-like	鈣	LOC4344262	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g18020	低溫反應
LOC4344293	B3 domain-containing protein Os07g0679700-like	逆境	LOC4344238	pentatricopeptide repeat-containing protein At4g32430, mitochondrial	低溫反應
LOC4344202	momilactone A synthase	水稻發芽低溫反應	LOC4344258	F-box/kelch-repeat protein SKIP6	ABA
LOC4344196	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC112936104	RNA pseudouridine synthase 6, chloroplastic	葉綠體
LOC4344197	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344233	ethylene-responsive transcription factor FZP-like	乙烯
LOC4344198	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344266	ethylene-responsive transcription factor RAP2-3	乙烯



LOC4344199	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC107275674	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 10-like	逆境
LOC107277777	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344113	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 57-like	逆境
LOC4344201	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344296	probable WRKY transcription factor 70	轉錄
LOC4344203	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344309	protein PYRICULARIA ORYZAE RESISTANCE 21-like	防禦
LOC4344204	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC107281693	dirigent protein 5	低溫反應
LOC4344205	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344084	dirigent protein 5-like	低溫反應
LOC4344206	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344304	probable calcium-binding protein CML24	鈣
LOC4344207	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344165	aspartyl protease 25-like	ABA
LOC107278232	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344100	probable protein phosphatase 2C 65	磷酸化
LOC4344208	momilactone A synthase-like	水稻發芽低溫反應	LOC4344240	protein SRC2	低溫反應
LOC112939758	U2 spliceosomal RNA	轉錄	LOC4344210	superoxide dismutase [Cu-Zn] 2-like	氧化還原
LOC4344106	calcium-binding protein 39	鈣	LOC4344148	magnesium-chelatase subunit ChlH, chloroplastic	葉綠體



LOC4344307	probable galacturonosyltransferase 7	糖解	LOC107278765	SAC3 family protein B	轉錄
LOC4344105	probable galacturonosyltransferase-like 4	糖解	LOC4344086	bZIP transcription factor 60-like	轉錄
LOC112936082	protein trichome birefringence- like 10	低溫反應	LOC4344306	probable ATP-dependent DNA helicase RecQ	轉錄
LOC107275922	protein trichome birefringence- like 11	低溫反應	LOC4344171	F-box protein SKIP5	ABA
			LOC4344181	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	泛素



