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[1]

劉祐廷、王聖善、陳榮坤[2]

摘　要

劉祐廷、王聖善、陳榮坤。2020。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。

秈稻耐寒性不佳，於臺灣地區一期作秧苗期容易遭遇低溫而發生寒害，造成農民嚴重損失。為改善秈稻幼苗耐寒性，本研究建立幼苗耐寒性外表型篩選模式，以幼苗耐寒性良好的臺粳 9 號作為貢獻親，利用回交育種法育成臺中秈 17 號幼苗耐寒性近似同源系 (near-isogenic line) NSY1051070 號，其農藝性狀與臺中秈 17 號相似，且成功改善幼苗耐寒性。本研究進一步利用臺中秈 17 號、臺粳 9 號與 NSY1051070 號作為試驗材料進行次世代定序分析，利用獲得之高密度單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分子標誌，進行幼苗耐寒性之數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 的探勘，結果顯示 NSY1051070 號帶有來自臺粳 9 號的 8 個染色體置換區間，此 8 個區間為 NSY1051070 號幼苗耐寒性潛在 QTLs，可作為水稻幼苗耐寒性之基因定位及分子標誌開發的基礎，將有助於國內秈稻品種幼苗耐寒性之改良。

現有技術：回交育種法育成優良品種的近似同源系，改善其缺陷性狀。
創新內容：開發幼苗耐寒性的潛力分子標誌，提升育種選拔效率。
對產業影響：有助於改善國內秈稻品種幼苗耐寒性，降低農民生產風險。

關鍵字：水稻、幼苗耐寒性、次世代定序、分子標誌
接受日期：2020 年 12 月 16 日

1. 行政院農業委員會臺南區農業改良場研究報告第 524 號。
2. 行政院農業委員會臺南區農業改良場助理研究員、助理研究員、副研究員兼嘉義分場分場長。712 臺南市新化區牧場 70 號。

前　言

水稻為我國主要的糧食作物，且為我國國人主食之一。亞洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 大致可分為秈稻 (*indica*) 與粳稻 (*japonica*) 及熱帶型粳稻 (*javanica*) 三種亞型，而栽培品種主要以秈稻及粳稻居多。秈稻主要分布於熱帶地區，分蘗性強、耐高溫、不耐寒、脫粒性高、米粒細長，米質硬且不黏；相對於秈稻，粳稻分布於溫帶地區，分蘗性較差，不耐高溫，但較耐寒，不易脫粒，米粒短圓，米質軟黏。我國屬於熱帶及亞熱帶氣候，粳稻及秈稻皆適合栽培。影響水稻栽培生產的主要因素為病蟲害及氣候因子，病蟲害可透過適當的栽培管理及農藥進行防治，氣候因子則難以藉由人為方式改變，而氣候因子中低溫對於水稻栽培有嚴重影響 [17]。

臺灣地區水稻栽培期分為兩個期作，一期作插秧期為氣溫寒冷的 1 ～ 3 月，收穫期為高溫的 5 ～ 7 月；二期作插秧期為高溫的 7 ～ 8 月，收穫期為溫度較低的 10 ～ 12 月，容易遭受低溫影響的期間為一期作的秧苗期及孕穗期，與二期作的生育後期。秧苗期若遭遇其生長臨界溫度 10℃以下的低溫，會出現葉片黃化、生長遲緩及減少分蘗等現象，影響嚴重度依據低溫程度及持續的時間而不同，嚴重者甚至萎凋死亡 [1,18]。孕穗期如出現 20℃以下的低溫，將使得花粉發育不良，稔實率降低，導致產量下降 [25]。由於秈稻的耐寒性較粳稻差 [8,15]，一期作秈稻幼苗期的耐寒性是亟需解決的問題，育成具有幼苗耐寒性的秈稻品種，將能有效降低寒害造成之損失，強化產量之穩定性。

水稻幼苗耐寒性為一數量性狀 [7,27]，數量性狀容易受外在環境影響，導致外表型選拔困難。利用數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 分析方法可找出與該性狀有關的染色體區間，建立 DNA 分子標誌以輔助選拔，提升選拔效率，縮短育種時間。DNA 分子標誌是遺傳分析和育種選拔的重要工具，能建構遺傳圖譜及進行基因座定位 [26]，同時可用於分子標誌輔助育種 (marker-assisted selection)，使難以選拔的數量性狀，能藉由緊密連鎖的分子標誌在早期世代進行有效的篩選，提升選拔效率 [13]。

由於次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) 技術的發明，核酸定序所需的時間與經費大幅降低，研究人員更容易進行 DNA 分子標誌開發 [5]。Baird 等人 [10] 更是發展出了以限制酶位點標定方法 (restriction-site associated DNA, RAD) 來簡化基因體，只對族群中各別個體基因體組之特定限制酶切位旁的核酸進行解序，找出特定單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位點，而不需進行全基因體定序，即可以更低之成本開發 DNA 分子標誌，此後也衍生出許多類似方法，例如 genotyping-by-sequencing (GBS)[14] 與 double digest restriction-site associated DNA (ddRAD)[23]。

為改善秈稻幼苗耐寒性，本研究建立水稻幼苗耐寒性外表型篩選模式，選擇不具幼苗耐寒性且為栽培面積最大的加工用秈稻品種臺中秈 17 號為輪迴親本，與具幼苗耐寒性的粳稻品種臺粳 9 號進行雜交，利用回交育種法改善臺中秈 17 號幼苗耐寒性，育成農藝性狀與臺中秈 17 號相近的近似同源系 (near-isogenic line) NSY1051070 號，成功改善該品種幼苗耐寒性。後續採用 ddRAD 方法進行臺中秈 17 號、臺粳 9 號及 NSY1051070 號的次世代定序分析，利用大量短片段 DNA 的定序資料進行品種 / 系間的比對，獲得高密度的 SNP 分子標誌，用以解析幼苗耐寒性狀位於染色體的可能區間，作為水稻幼苗耐寒性基因定位及水稻幼

苗耐寒性分子標誌開發之基礎。

材料與方法

一、水稻幼苗耐寒性外表型篩選

水稻種子以 2.5% 次氯酸鈉進行消毒，清洗後置於 30℃水浴槽 48 小時催芽後，將種子個別移置穴盤，栽培介質使用滅菌後栽培土。將 40 公克臺肥 39 號溶解於 1000 毫升 RO 水中調配肥水，每穴澆灌 2.5 毫升肥水一次，置於 30/25℃生長箱，待生長至 2.5 葉齡，移入 5/5℃低溫暗室，低溫處理 5 天後，移出至 25/20℃生長箱，經恢復生長 8 天後進行外表型分析，試驗條件參考張等人 [3]、Lee 等人 [20] 與戴等人 [6] 的研究進行設定。由於水稻幼苗耐寒性為數量性狀，本研究參考國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 的水稻幼苗寒冷耐受性評估方法 [16]，將外表型分別依受損程度分為 5 個耐寒反應等級 (Cold Tolerance Scale, CTS)，CTS1、CTS3、CTS5、CTS7 及 CTS9。CTS1 為地上部無明顯受損，生長無停滯現象；CTS3 為地上部些微受損，生長些微遲滯；CTS5 為地上部受損，生長遲滯；CTS7 為地上部明顯受損，生長停滯；CTS9 為地上部明顯萎凋，植株死亡。

二、利用回交育種法建立具幼苗耐寒性的秈稻近似同源系

本研究為育成具幼苗耐寒性的秈稻新品系，以不具幼苗耐寒性的秈稻品種臺中秈 17 號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Sen 17, TCS17) 為輪迴親，具幼苗耐寒性的粳稻品種臺粳 9 號 (*Oryza sativa* L. cv. Taiken 9, TK9) 為貢獻親進行雜交，於 F_2 及回交 F_2 分離世代依幼苗耐寒性篩選模式篩檢耐寒幼苗，挑選耐寒性優良之單株再回交臺中秈 17 號，共回交 3 次，後續自交至 BC_3F_6 世代，育成具有幼苗耐寒特性並與臺中秈 17 號相近的近似同源系 NSY1051070 號。

三、農藝性狀及產量調查

為比較臺中秈 17 號與 NSY1051070 號之農藝性狀及產量，試區種植採逢機完全區集設計，三重複，每小區 50 株，行株距 30 x 15 公分，多本植。收穫前每小區逢機量測株高及穗數各 10 株，於成熟期各小區逢機收取 3 株進行產量構成因素調查，最後將剩餘稻株收割脫粒、烘乾並秤取乾穀重量，依行株距及株數推算產量。

四、建立 ddRAD 定序圖書庫及定序分析

本研究以臺中秈 17 號、臺粳 9 號及 NSY1051070 號作為參試材料，進行 ddRAD 定序圖書庫的建構。各參試材料各種植 10 株，於 3 葉齡各取 3 株個體，共 9 個樣品，分別以 CTAB 方法 [21] 抽取 genomic DNA，萃取之 DNA 樣品進行定量後，利用 ddRAD 方法進行基因體簡化及建庫，建庫方法及後續定序資料分析方法參照王等人 [2]，限制酶選擇 *Pst*I 與 *Mse*I。建構完成的 ddRAD 定序圖書庫委託基龍米克斯公司以 Illumina X-Ten 次世代定序平臺進行 150 bp paired-end 核酸定序，定序量為 1 個 lane。定序得到之原始資料只選取 R1 的序列以 CLC Genomics Workbench v.11.0 軟體執行定序序列的條碼分類及品質篩選工作，接著以 Bowtie2[22] 軟體與水稻的參照序列 Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-V5 (簡稱 IRGSPV5) 進行比對，最後利用 stacks 軟體套件 [12]，各選取臺中秈 17

號與臺粳 9 號經品質篩選後保留最多定序序列數量的一個樣品，將之指定為親本，以建立 SNP 分子標誌的基因座目錄 (catalog) 及判定基因座的基因型，篩選條件設定為每一基因座的定序深度 (read depth) 至少為 10，以避免基因座中異質結合基因型因為定序深度太低而誤判，另捨棄基因座缺值超過 3 個樣品的基因座。

五、數量性狀基因座區間探勘

數量性狀基因座的區間探勘利用 R 軟體 (R-4.0.3 版 , R Core Team 2020) 及 R/qtl 套件 [11] 進行，針對每個具有 SNP 分子標誌的基因座進行分析。

結果與討論

一、水稻幼苗耐寒性外表型篩選模式之建立

幼苗耐寒性外表型篩選模式根據張等人 [3]、Lee 等人 [20]、戴等人 [6] 的研究設定苗齡、處理溫度、處理時間等條件，前述學者針對我國水稻秈稻及粳稻栽培品種進行耐寒性相關研究發現，苗齡介於 2 ～ 3 葉齡、處理溫度為 4 ～ 6℃、處理時間為 4 ～ 7 天時，幼苗存活率差異最大。本研究發現參試材料於 2.5 葉齡在 5℃暗室下處理 5 天，經恢復生長 8 天後，外表型有明顯差異，故以此作為幼苗耐寒性外表型篩選模式之篩選條件。本研究之幼苗耐寒性外表型篩選模式不評估存活率，只針對外表型進行評估，依受損程度分為 5 個耐寒反應等級 (CTS)，F_2 及 F_2 回交分離世代皆利用此模式進行選拔。幼苗耐寒性外表型篩選模式如圖 1 顯示，臺粳 9 號耐性最佳，為 CTS1，植株只有第一葉輕微黃化，而臺中秈 17 號耐性最差，為 CTS9，植株凋萎死亡。子代耐性介於 CTS3 至 CTS9，CTS3 為植株輕微受損，生長些微受到抑制；CTS5 為植株生長明顯受到抑制，相較於 CTS1 及 CTS3 植株的新葉第 4 葉已發育抽出，CTS5 植株則尚未觀察到第 4 葉；CTS7 為植株受損嚴重，第 1、2 葉都萎凋，而第 3 葉也有黃化情形，生長同樣明顯受到抑制；CTS9 為植株死亡。

二、選育臺中秈 17 號幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號

本研究於 2011 年利用臺中秈 17 號與臺粳 9 號進行雜交，至 F_2 後代依幼苗耐寒性外表型篩選模式進行選拔，挑選具優良幼苗耐寒性 F_2 單株，與臺中秈 17 號進行回交，回交之 F_2 後代 (BC_1F_2、BC_2F_2、BC_3F_2) 一樣依幼苗耐寒性外表型篩選模式選拔耐寒性優良單株，於 BC_3F_2 世代自交 4 代後育成臺中秈 17 號幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號 (BC_3F_6)，並於 BC_3F_3 依幼苗耐寒性外表型篩選模式確認自交後代之幼苗耐寒性狀無分離情形，選育流程如圖 2。

利用幼苗耐寒性篩選模式比較臺粳 9 號、臺中秈 17 號及其近似同源系 NSY1051070 號之耐寒性，如圖 3 顯示，相較於臺中秈 17 號，NSY1051070 號明顯改善了幼苗耐寒性。

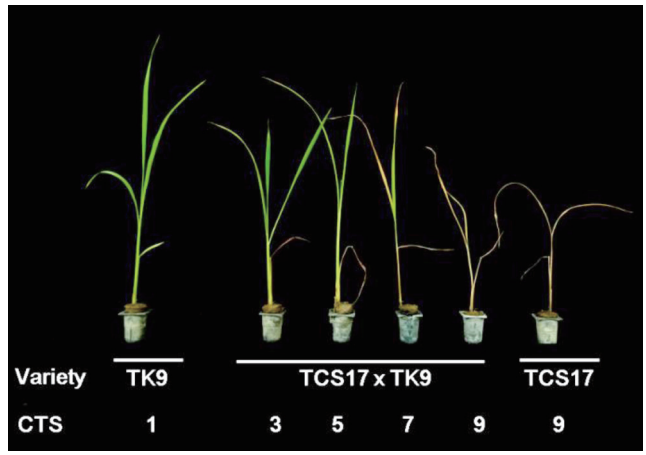

圖 1.　水稻幼苗耐寒性外表型篩選模式評估低溫處理後之幼苗外表型

Fig. 1. Using the screening model of the cold tolerance phenotype at the seedling stage to analyze the phenotype of the seedlings

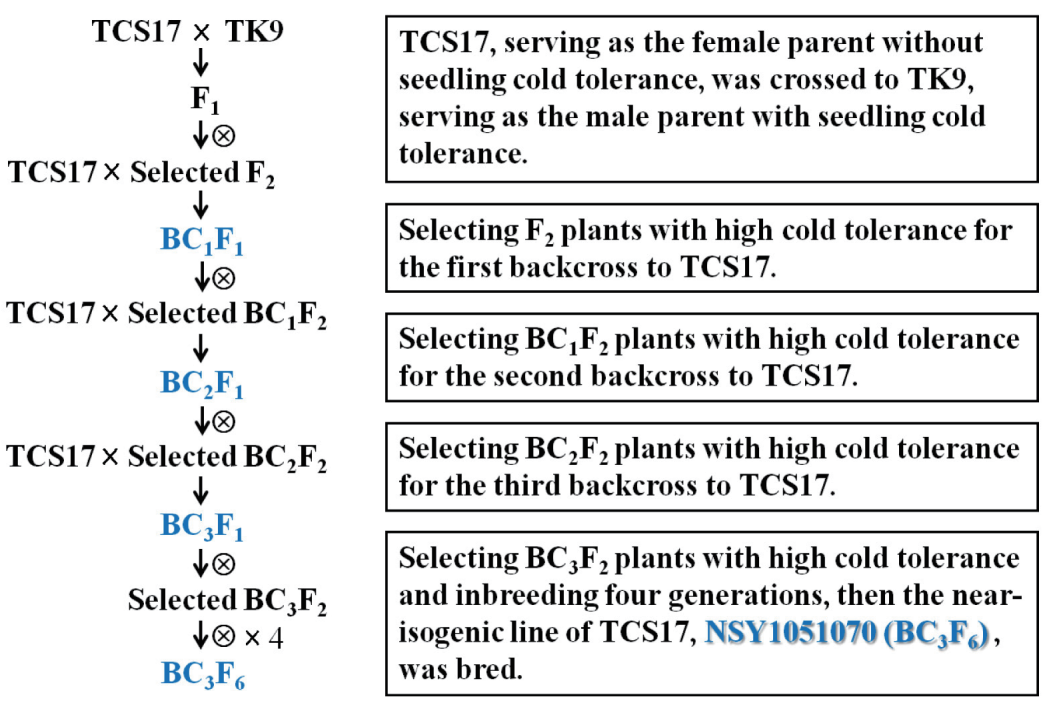

圖 2.　水稻臺中秈 17 號幼苗耐寒性近似同源系選育過程

Fig. 2. The breeding scheme of the seedling cold-tolerant near-isogenic line of *indica* TCS17

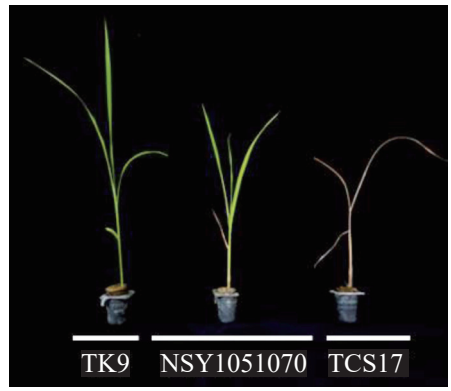

圖 3.　水稻臺中秈 17 號近似同源系 NSY1051070 號成功改善幼苗耐寒性

Fig. 3. The seedling cold-tolerant near-isogenic line of *indica* TCS17, NSY1051070, successfully improved its cold tolerance

三、臺中秈 17 號與幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號之農藝性狀及產量比較

以臺中秈 17 號為對照品種，進行 NSY1051070 號之農藝性狀及產量比較試驗，2020 年一期作試驗結果 (表 1) 顯示，NSY1051070 號生育期為 130 天，略多於臺中秈 17 號的 128 天；NSY1051070 號的穗長及千粒重顯著低於臺中秈 17 號，而產量無顯著差異。NSY1051070 號的千粒重 31.5 克，顯著低於臺中秈 17 號的 35.3 克，然而在產量方面卻無顯著差異，此原因可能為 NSY1051070 號的穗數較多，兩者雖然在穗數方面無顯著差異，但 NSY1051070 號的穗數為 15.1 穗，高於臺中秈 17 號的 12.9 穗。

表 1.　2020 年一期作臺中秈 17 號與其耐寒性近似同源系之農藝性狀及產量

Table 1. The agronomic characters and yield of TCS17 and near-isogenic line NSY1051070 in the first crop season of 2020

Variety	Growth duration (day)	Plant height (cm)	Panicle number (no.)	Panicle length (cm)	Spikelet/ panicle (no.)	Fertility (%)	1,000-grain weight	Yield	
								kg/ha	Ratio (%)
NSY1051070	130	83.9	15.1	17.5**	83.4	85.7	31.5**	6,716	97.6
TCS17 (CK)	128	86.9	12.9	20.1	87.1	87.7	35.3	6,883	100

*, ** Significantly at 0.05 and 0.01 levels by t-test, respectively.

四、ddRAD 定序結果與幼苗耐寒性數量性狀基因座區間探勘

(一) 利用 ddRAD 定序結果建立 SNP 分子標誌

參試材料共 9 個樣品，ddRAD 定序結果經品質篩選處理後，總共獲得 39,580,260 條定序長度為 150 bp 的定序序列，各樣品的定序序列數量介於 1,864,076 條至 7,611,919 條之間。作為親本的臺中秈 17 號及臺粳 9 號樣品的定序序列數量分別為 5,905,862 條及 7,611,919 條。

利用 Bowtie2 軟體將前述定序序列與水稻參照序列 IRGSPV5 進行比對組裝，再透過 stacks 軟體比對親本定序序列，分析建立基因座目錄。分析結果總共建構

了 91,429 個基因座，而符合篩選條件的共有 44,253 個基因座，於樣品間比對建立 SNP 分子標誌，得到 3,712 個具有多型性的基因座。

(二) 幼苗耐寒性數量性狀基因座區間探勘

本研究利用 R 軟體對獲得之具 SNP 分子標誌的基因座進行分析，結果顯示 NSY1051070 號於 7 對染色體上共帶有 8 個臺粳 9 號的染色體置換區間，以此結果繪製物理圖譜 (圖 4)。該 8 個染色體區間為幼苗耐寒性 QTLs 的可能位置，分別位於第 1 對染色體的 26.9 ～ 29.1 Mb 位置及 32.7 ～ 35.5 Mb 位置、第 3 對染色體的 24.5 ～ 30.4 Mb 位置、第 4 對染色體的 0 ～ 5.6 Mb 位置、第 6 對染色體的 26.0 ～ 26.2 Mb 位置、第 7 對染色體的 17.2 ～ 21.3 Mb 位置、第 9 對染色體的 6.6 ～ 7.2 Mb 位置、第 11 對染色體的 25.8 ～ 29.0 Mb 位置，背景回復率為 93.39%，與預期的 93.75% 理論值約略相近。

水稻耐寒性是學術界相當重視的研究主題，目前為止有許多水稻幼苗耐寒性 QTL 相關的研究發表，茲將前人研究對照本研究結果整理於表 2。本研究發現之第 1 對染色體上的兩個幼苗耐寒性潛在 QTLs，其區間分別與 Yang 等人 [28] 及 Andaya 等人 [7] 發現的幼苗耐寒性 QTLs 位置重疊，且區間範圍皆較窄，有機會進一步縮小此二個幼苗耐寒性 QTLs 區間；第 3、4 對染色體的幼苗耐寒性潛在 QTLs，其區間分別與 Koseki 等人 [19] 及 Andaya 等人 [7,9] 發現的區間重疊，區間範圍皆較寬，未來設計分子標誌能以前人研究縮小目標區間；第 7 對染色體的幼苗耐寒性潛在 QTL，其區間與 Ranawake 等人 [24] 發現的區間有部分重疊，取該重疊交集的區間，可能進一步縮小此幼苗耐寒性 QTL 區間；第 11 對染色體的幼苗耐寒性潛在 QTL，其位置與多篇前人研究 [4,6,19,24] 發現的幼苗耐寒性主效 QTLs 重疊或部分重疊，其中 Koseki 等人 [19] 已完成該主效 QTL 的精細定位，將區間範圍縮小至 60 kb，將來以此區間設計分子標誌能夠更精準的導入水稻幼苗耐寒性；第 6、9 對染色體的幼苗耐寒性潛在 QTLs 尚未有相關研究與其區間重疊，仍需進一步研究確認是否與幼苗耐寒性相關。

本研究針對親本水稻臺中籼 17 號、臺粳 9 號及臺中籼 17 號幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號進行次世代定序，完成幼苗耐寒性 QTLs 的探勘。後續將進一步建立子代大量分離族群，利用本研究建立之幼苗耐寒性外表型篩選模式，配合次世代定序分析，進行 QTL 精細定位，期望定位幼苗耐寒性主效 QTL，以開發分子標誌，助益於具幼苗耐寒性籼稻品種之選育。

結　　論

本研究已建立水稻幼苗耐寒性外表型篩選模式，並且利用回交育種法，搭配幼苗耐寒性外表型篩檢，成功將臺粳 9 號之幼苗耐寒性導入臺中籼 17 號，選獲農藝性狀與臺中籼 17 號相近之幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號。後續進一步進行臺中籼 17 號、臺粳 9 號及 NSY1051070 號之次世代定序分析，完成水稻幼苗耐寒性數量性狀基因座的探勘，作為未來水稻幼苗耐寒性基因精細定位及水稻幼苗耐寒性分子標誌開發的基礎，將有助於國內籼稻品種幼苗耐寒性之改良。

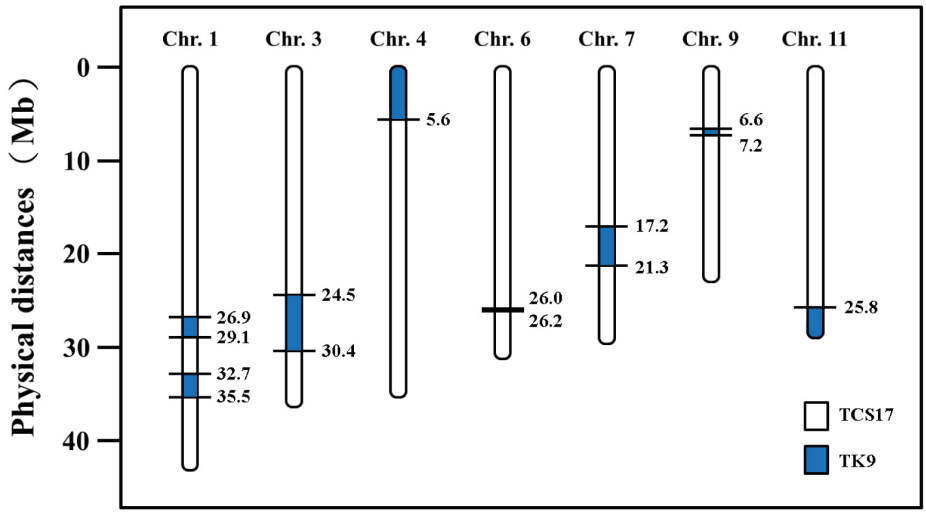

圖 4.　水稻臺中秈 17 號幼苗耐寒性近似同源系 NSY1051070 號之物理圖譜

Fig. 4. Physical map of the seedling cold-tolerant near-isogenic line of *indica* TCS17

表 2.　水稻幼苗耐寒性數量性狀基因座相關之前人研究

Table 2.　Previous studies of cold tolerance QTL at the rice seedling stage

QTL	Chromosome	Marker interval (Mb)	Reference
qCTSS-1	1	(21.45~38.22)	(28)
Potential QTL	1	(26.9~29.1)	This study
qCTS1	1	RM297~RM319 (32.1~33.7)	(7)
Potential QTL	1	(32.7~35.5)	This study
qCTS2(2)	2	RM109~RM4355 (0.18~4.26)	(24)
qCTSS-2a	2	(8.21~13.61)	(28)
qCTSS-2b	2	(13.61~23.57)	(28)
qCTS3	3	RM200~RM85	(7)
qCtss3	3	S0292~S0036 (approximately 23.9~25.1)	(19)
Potential QTL	3	(24.4~30.4)	This study
Potential QTL	4	(0~5.6)	This study
qCTS4-1	4	RM335~RM261 (0.66~0.69)	(7)
qCTS4-2	4	RM255~RM348 (30.8~32.7)	(7)
qCTSS-5	5	(21.28~29.96)	(28)
qcts6.1	6	RM276~RM6818 (6.2~16)	(4,6)
qCTS6-1	6	RM253~RM50 (approximately range 5.4~7.4)	(7)
qCTS6-2	6	RM3~RM325a (approximately 19.0~24.0)	(7)
Potential QTL	6	(26.0~26.2)	This study

表 2.　水稻幼苗耐寒性數量性狀基因座相關之前人研究 (續)

Table 2.　Previous studies of cold tolerance QTL at the rice seedling stage (continued)

QTL	Chromosome	Marker interval (Mb)	Reference
Potential QTL	7	(17.2~21.3)	This study
qCTS7(2)	7	RM6767~RM2752(17.5~22.6)	(24)
qCTSS-8	8	(14.57~27.68)	(28)
qCTS8-2a	8	RM223~RM284 (20.7~21.1)	(7)
qCTS8-1	8	RM284~RM230 (21.1~25.8)	(7)
qCTS8(2)	8	RM1235~RM72	(24)
Potential QTL	9	(6.6~7.2)	This study
qCTSS-10	10	(12.64~23.19)	(28)
qCTS10	10	RM239~RM284	(7)
qCtss10	10	S0692~S0693	(19)
qCTS11(1)-1	11	RM167~RM202 (4.1~9.0)	(24)
qcts11.1	11	RM26998~RM224 (22.2~27.0)	(4,6)
qCtss11	11	S0181~S0204 (approximately 27.5~28.1), fine mapping (26.1~26.2)	(19)
qCTS11(1)-2	11	RM224~RM206 (24.4~29.0)	(24)
qCTS11-1	11	RM20~RM4	(7)
Potential QTL	11	(25.8~29.0)	This study
qCTS12	12	RM5746~RM7003 (5.1~6.8)	(9)

引用文獻

1. 丁文彥。極端溫度對水稻生育的影響。2012。臺東區農業專訊 82 期：16-18。
2. 王聖善、朱詠筑、蔡佩樺、楊藹華。2019。利用 SNP 分子標誌建立胡瓜雜交種子純度檢測技術。臺南區農業改良場研究彙報第 74 號：27-35。
3. 張新雄、顧元亮、賴光隆。1974。水稻秧苗抗寒性之研究 I. 不同苗齡及類型品種間抗寒力之差異。中華農會學報新 86：18-27。
4. 楊珮雯。2012。水稻幼苗耐冷性數量性狀基因座之定位。國立臺灣大學農藝學研究所碩士論文。臺北。臺灣。
5. 謝明修、吳東鴻、陳凱儀。2014。使用限制酶位點標定之核酸定序法進行粳稻雜交組合之穗上發芽數量性狀基因座的遺傳定位。作物、環境與生物資訊 11：11-25。
6. 戴宏宇。2010。臺農 67 號與臺中再來 1 號水稻雜交組合之幼苗耐冷性數量性狀基因座的定位。國立臺灣大學農藝學研究所碩士論文。臺北。臺灣。
7. Andaya, V. C. and Mackill, D. J. 2003a. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. J. Expt. Bot. 54: 2579-2585.

8. Andaya, V. C. and D. J. Mackill. 2003b. 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.
9. Andaya, V. C. and T. H. Tai. 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. Theor. Appl. Genet. 113: 467-475.
10. Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver, Z. A. Lewis, E. U. Selker, W. A. Cresko and E. A. Johnson. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS One 3(10): e3376.
11. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. Bioinformatics 19: 889-890.
12. Catchen, J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores and W. A. Cresko. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. Mol. Ecol. 22: 3124-3140.
13. Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the 21st century. Phil. Trans. Royal. Soc. B. Rev. 363: 557-572.
14. Elshire, R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler and S. E. Mitchell. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS One 6(5): e19379.
15. Glaszmann, J. C., R. N. Kaw and G. S. Khush. 1990. Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.). Euphytica 45: 95-104.
16. IRRI. 2002. Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
17. Jacobs, B. C. and C. J. Pearson. 1999. Growth, development and yield of rice in response to cold temperature. J. Agron. Crop Sci. 182(2): 79-88.
18. Kaneda, C. and H. M. Beachell. 1974. Responses of *indica-japonica* rice hybrids to low temperature. SABRAO J. 6(1): 17-32.
19. Koseki, M., N. Kitazawa, S. Yonebayashi, Y. Maehara, Z. X. Wang abd Y. Minobe. 2010. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage. Mol. Genet. Genom. 284: 45-54.
20. Lee, T. M., H. S. Lur and C. Chu. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. Plant Cell Environ. 16: 481-490.
21. Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
22. Langmead, B. and S. L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat. Methods 9: 357-359.
23. Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher and H. E. Hoekstra. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS ONE 7(5): e37135.
24. Ranawake, A. L., O. E. Manangkil, S. Yoshida, T. Ishii, N. Mori and C. Nakamura. 2014. Mapping QTLs for cold tolerance at germination and the early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). Biotechnol. Biotechnol. Equip. 28(6): 989-998.

25. Thakur, P., S. Kumar, J. A. Malik, J. D. Berger and H. Nayyar. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. Environ. Exp. Bot. 67: 429-443.
26. Wu, K. S. and S. D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol. Gen. Genet. 241: 225-235.
27. Yan, C., X. Li, Z. Cheng, H. Yu, M. Gu and L. Zhu. 1998. Identification of QTL for cold tolerance at early seedling stage in rice (*Oryza sativa*) via RFLP markers. Chin. J. Rice Sci. 13: 134-138.
28. Yang, Z., D. Huang, W. Tang, Y. Zheng, K. Liang, A. J. Cutler, and W. Wu. 2013. Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. PLoS One 8(7): e68433.

Breeding of *indica* near-isogenic line with seedling cold tolerance and exploration of QTLs associated with cold tolerance at the seedling stage in rice[1]

Liu, Y. T., S. S. Wang, R. K. Chen[2]

Abstract

Indica rice (*Oryza sativa* L.) is sensitive to low temperature. Low temperature stress is common for the rice seedlings of first crop, and caused enormous yield loss in Taiwan. To improve the cold tolerance of *indica* rice seedlings, a screening model for the cold tolerance phenotype at the seedling stage was established in this study. We selected the *japonica* cultivar Taiken 9 (TK9) as the donor parent for its seedling cold tolerance, and used backcrossing breeding to breed a near-isogenic line of *indica* cultivar Taichung Sen 17 (TCS17), NSY1051070, which is cold-tolerant at the seedling stage. The agronomic traits of NSY1051070 are similar to TCS17, but it is more cold-tolerant than TCS17 at the seedling stage. Then we used TCS17, TK9 and NSY1051070 to do next-generation sequencing (NGS), and developed high-density single nucleotide polymorphism (SNP) markers for exploration of quantitative trait locus (QTL) associated with cold tolerance at the seedling stage. The results showed that NSY1051070 was with eight potential QTLs associated with seedling cold tolerance from TK9. These results may become the basis for the mapping of rice seedling cold tolerance genes and for the development of molecular markers of rice seedling cold tolerance, and it can help to improve the seedling cold tolerance of *indica* varieties in Taiwan.

What is already known on this subject?
Backcross breeding is an effective method to breed the near-isogenic lines of elite variety and improves its defect.

What are the new findings?
We developed potential molecular markers of seedling cold tolerance, improved the efficiency of breeding selection.

What is the expected impact on this field?
The results in this study contribute to improve seedling cod tolerance of *indica* variety in Taiwan, and allow farmers to reduce risks of production.

Key words: Rice, Seedling cold tolerance, Next-generation sequencing, Molecular marker
Accepted for publication: December 16, 2020

---

1. Contribution No. 524 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.
2. Assistant Researcher, Assistant Researcher, Associate Researcher and Head of Chiayi Branch, Tainan District Agricultural Research and Extension Station. 70 Muchang, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.