

## مکان‌یابی چندصفتی QTLها برای شاخص‌های تحمل به خشکی در برنج

مهدی رحیمی<sup>۱</sup>، حمید دهقانی<sup>۲\*</sup>، بابک ربیعی<sup>۳</sup> و علیرضا ترنگ<sup>۴</sup>

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری اصلاح نباتات و دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس،  
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۴- استادیار پژوهش پژوهشکده بیوتکنولوژی  
کشاورزی منطقه شمال کشور

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۷)

### چکیده

اصلاح برنج برای تحمل به خشکی نیازمند ارزیابی صحیح تنوع موجود در جمعیت‌های اصلاحی و تجزیه ژنتیکی شاخص‌های مرتبط با تحمل به خشکی است. در این مطالعه، ۱۵۰ فامیل  $F_5$  حاصل از تلاقی بین ارقام سپیدرود (*Indica*) و غریب (*Indica*) به منظور مکان‌یابی چند صفتی نواحی ژنومی (QTLs) کنترل‌کننده شاخص‌های تحمل به خشکی در دو شرایط نرمال و تنش مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه بای‌پلات نشان داد که شاخص‌های تحمل به تنش (STI)، میانگین بهره‌وری (MP)، میانگین هندسی بهره‌وری (GMP) و میانگین هارمونیک (HM) شاخص‌های مناسب برای انتخاب ژنوتیپ‌های پرمحصول در برنامه‌های کاربردی اصلاح برنج می‌باشند. شناسایی QTLها برای هر شاخص با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب نشان داد که سه، دو و سه QTL به ترتیب شاخص‌های MP، HM، GMP و STI را کنترل می‌نمایند، اما تجزیه مشترک داده‌ها برای بررسی روابط ژنتیکی بین این شاخص‌ها با استفاده از روش مکان‌یابی چند صفتی نشان داد که روابط ژنتیکی معنی‌داری بین شاخص‌های مورد مطالعه وجود دارد، به طوری که هیچ یک از QTLهای شناسایی شده به طور مستقل یک شاخص را کنترل نکرده و به طور مشترک کنترل چند شاخص را بر عهده داشتند. نتایج این پژوهش نشان داد که تجزیه مشترک چند صفتی نه تنها QTLهای اضافی را شناسایی می‌کند، بلکه روابط ژنتیکی بین صفات با همبستگی بالا را نیز در سطح مولکولی آشکار می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: برنج، تجزیه چند صفتی، شاخص‌های تحمل به خشکی، QTL

## مقدمه

تجزیه چندصفتی (Multi-trait analysis) به عنوان روشی مناسب برای تجزیه ژنتیکی صفات همبسته، همه صفات را به طور همزمان در یک مدل وارد نموده و می‌تواند همبستگی میان صفات را محاسبه کند (Fang *et al.*, 2008). تجزیه چندصفتی، همبستگی‌های ژنتیکی و محیطی بین صفات را وارد محاسبات می‌کند و می‌تواند فرضیه‌های مختلفی که در برگرفته طبیعت همبستگی‌های ژنتیکی همانند پلیوتروپی در مقابل پیوستگی نزدیک و اثرات متقابل محیط در ژنوتیپ هست را آزمون نماید. علاوه بر آن، تجزیه چندصفتی می‌تواند ماتریس واریانس-کوواریانس ژنتیکی بین صفات را برآورد نماید و از آن برای تجزیه ژنتیکی صفات همبسته در شرایط استفاده از QTLهای فردی استفاده کند (E Silva *et al.*, 2012). از آنجایی که مکان‌یابی چندصفتی QTLها اطلاعات همبستگی فنوتیپی چندین صفت را به طور همزمان مورد استفاده قرار می‌دهد و یا یک صفت را در چندین محیط ارزیابی و مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد، قدرت شناسایی بیشتری دارد و دقت مکان‌یابی و برآورد اثرات را نسبت به مکان‌یابی تک صفتی افزایش می‌دهد، زیرا جستجوی QTLها در حالت تک صفتی، اطلاعات مربوط به تأثیرات مشترک داده‌های یک QTL روی بیشتر از یک صفت، بیشتر از یک محیط و یا در بیشتر از یک مرحله را مورد توجه قرار نمی‌دهد (Guo *et al.*, 2008).

در ارزیابی ژرم‌پلاسماهای گیاهی، اصلاح‌کنندگان علاقه به ارزیابی همزمان چندین صفت نسبت به ارزیابی تک صفت دارند، زیرا در انتخاب غیرمستقیم برای بهبود گیاهان می‌توان از همبستگی‌های ژنتیکی بین صفات ثانویه که وراثت‌پذیری بالایی دارند، برای بهبود صفات اولیه که وراثت‌پذیری پایینی دارند یا به سختی اندازه‌گیری می‌شوند، استفاده نمود (Malosetti *et al.*, 2008). روش‌های زیادی برای مکان‌یابی چند صفتی QTLها پیشنهاد شده است (Jiang and Zeng, 1995; Knott and Haley, 2000; Hackett *et al.*, 2001; Korol *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). ژیانگ و زنگ (Jiang and Zeng, 1995) روش حداکثر درست‌نمایی را پیشنهاد کردند و نشان دادند که تجزیه چند صفتی می‌تواند دقت برآورد پارامترها را بهبود

برنج مهم‌ترین محصول غذایی در جهان و منبع اصلی تأمین مواد غذایی برای بیش از نصف جمعیت جهان است (Khush, 2005). خشک‌سالی مهم‌ترین عامل محدود کننده‌ی سازگاری ارقام پرمحصول برنج را به خصوص برای محیط‌های خشک و دیم است که در آن دوره‌های کوتاه کمبود آب خسارت زیادی ایجاد می‌کند (Lafitte *et al.*, 2007). ارزیابی عملکرد دانه معمول‌ترین معیار کاربردی برای توصیف سازگاری ارقام در محیط‌های پرتنش است (Fischer and Maurer, 1978; Gavuzzi *et al.*, 1997). مهم‌ترین روش بررسی واکنش ارقام به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، ارزیابی عملکرد ارقام در هر دو شرایط نرمال و تنش و سپس ارزیابی شاخص‌های تحمل و حساسیت است. رفتارهای سازگاری گیاه به تنش نقش مهمی در تحمل به تنش ایفا می‌کنند. این رفتارها توسط ژن‌ها کنترل می‌شوند و می‌توانند تحت شرایط تنش و گاهی در شرایط غیرتنش عمل کنند (Bouman and Tuong, 2001). در صورتی که بتوان با اعمال روش‌های مناسب، تعداد ژن‌ها، جایگاه ژنومی و سهم هر یک از آن‌ها را در کنترل تنوع فنوتیپی عملکرد دانه و این شاخص‌ها مشخص نمود، شاید بتوان همانند صفات تک ژنی به اصلاح این صفات پرداخت. روش‌های تجزیه QTL رهاکاری جدید و مناسب برای رسیدن به این هدف بوده و می‌توان از نتایج آن به خوبی در برنامه‌های به‌نژادی آینده استفاده نمود. (Rabiei and Sabouri, 2009)

روش‌های آماری که برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی یا QTLها استفاده می‌شوند، در سال‌های اخیر توسعه زیادی پیدا کرده‌اند. در ابتدا، تمامی روش‌های تجزیه QTL روی تک صفت متمرکز بودند و QTLهای کنترل‌کننده یک صفت را بدون توجه به ارتباط آن با سایر صفات کمی شناسایی می‌کردند (Guo *et al.*, 2008). اگرچه روش‌های مکان‌یابی تک صفتی QTLها به منظور درک اساس ژنتیکی صفات کمی در مطالعات زیادی استفاده شده است، اما این روش‌ها از روابط همبستگی ژنتیکی و محیطی بین صفات استفاده نمی‌کنند و از این‌رو برای تجزیه ژنتیکی صفاتی که همبستگی بالایی دارند، مناسب نمی‌باشند (Jiang and Zeng, 1995).

بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه پژوهشی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۸۹ انجام شد. در شرایط تنش خشکی آبیاری مزرعه پژوهشی ۳۰ روز پس از نشاء کاری به طور کامل متوقف شد و تا پایان دوره‌ی رشد گیاه ادامه داشت. در هر دو شرایط (نرمال و تنش خشکی)، بوته‌های لاین‌های  $F_5$  به همراه دو والد غریب و سپیدرود هر کدام در یک ردیف جداگانه که ۳۰ سانتی‌متر از هم فاصله داشتند، نشاکاری شدند. بوته‌ها ۳۰ روز پس از کاشت در خزانه (مرحله ۳-۴ برگه) به زمین اصلی منتقل شدند و فاصله بوته‌ها روی ردیف از هم ۲۰ سانتی‌متر بود. برای اندازه‌گیری عملکرد دانه در هر دو شرایط، کل دانه‌های پر هر لاین در هر تکرار بعد از رسیدن کامل دانه‌ها، برداشت و با ترازوی حساس مورد توزین قرار گرفت و سپس میانگین سه تکرار در هر شرایط آبیاری برای محاسبه ارزیابی شاخص‌های تحمل به خشکی مورد استفاده قرار گرفت. این اندازه‌گیری بر اساس دستورالعمل استاندارد ارزیابی صفات در برنج (Standard Evaluation System)، انجام شد (SES, 2002).

شاخص‌های تحمل به خشکی شامل شاخص حساسیت به تنش (SSI) (Fischer and Maurer, 1978)، شاخص تحمل (TOL)، شاخص میانگین بهره‌وری متوسط (MP) (Hossain *et al.*, 1990)، شاخص میانگین هندسی بهره‌وری (GMP)، شاخص تحمل تنش (STI) (Fernandez, 1992)، شاخص میانگین هارمونیک (HM) (Rosielle and Hamblin, 1981)، شاخص پایداری عملکرد (YSI) (Bouslama and Schapaugh, 1984) و شاخص عملکرد (YI) (Gavuzzi *et al.*, 1997) بود که بر اساس روابط زیر محاسبه شدند:

$$\text{Stress susceptibility index (SSI)} = \frac{1 - (Y_s/Y_p)}{1 - (\bar{Y}_s/\bar{Y}_p)} \quad (1)$$

$$\text{Mean productivity (MP)} = \frac{Y_p + Y_s}{2} \quad (5)$$

$$\text{Stress tolerance index (STI)} = \frac{Y_p + Y_s}{Y_p^2} \quad (6)$$

بخشد و قدرت بیشتری برای شناسایی QTLها نسبت به تجزیه تک صفتی داشته باشد. روش حداقل مربعات نیز که به وسیله نات و هالی (Knott and Haley, 2000) پیشنهاد شد، روشی ساده و سریع بوده و در مقایسه با تجزیه تک صفتی، علاوه بر اینکه می‌تواند قدرت شناسایی QTLهای پلیوتروپیک را افزایش دهد، دقت مکان‌یابی را نیز بهبود می‌بخشد (Fang *et al.*, 2008). در مقایسه با روش‌های مکان‌یابی تک صفتی، روش‌های مکان‌یابی چندصفتی با دقت بیشتری نواحی ژنومی مسئول همبستگی‌های ژنتیکی را که ناشی از پلیوتروپی یا پیوستگی ژنتیکی هستند را شناسایی می‌کند (Malosetti *et al.*, 2007).

هدف از این پژوهش، شناسایی QTLهای کنترل‌کننده شاخص‌های مقاومت به خشکی و بررسی روابط ژنتیکی بین آن‌ها با استفاده از روش مکان‌یابی چندصفتی در یک جمعیت  $F_5$  برنج به منظور استفاده از آن‌ها در انتخاب لاین‌های متحمل به خشکی بود.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۵۰ فامیل  $F_5$  حاصل از تلاقی دو رقم برنج ایرانی به اسامی غریب (یک رقم محلی گیلان با ارتفاع متوسط تا بلند، کیفیت پخت متوسط تا خوب، تعداد پنجه و خوشه کم و عملکرد پایین) به عنوان والد ماده و سپیدرود (یک رقم اصلاح شده و پاکوتاه ایرانی، کیفیت پخت و تبدیل پایین، تعداد پنجه و خوشه زیاد و عملکرد نسبتاً بالا) به عنوان والد نر استفاده شد. رقم غریب در مرحله گلدهی و رسیدگی یک رقم متحمل و رقم سپیدرود در این مرحله از رشد یک رقم حساس است. آزمایش در دو شرایط آبیاری (تنش خشکی و آبیاری نرمال) بر پایه طرح

$$\text{Harmonic mean (HM)} = \frac{2(Y_s \times Y_p)}{(Y_s + Y_p)} \quad (2)$$

$$\text{Yield stability index (YSI)} = \frac{Y_s}{Y_p} \quad (3)$$

$$\text{Tolerance index (TOL)} = Y_p - Y_s \quad (4)$$

$$\text{Geometric mean productivity (GMP)} = \sqrt{Y_p \times Y_s} \quad (7)$$

$$\text{Yield index (YI)} = \frac{Y_s}{\bar{Y}_s} \quad (A)$$

در این روابط،  $Y_p$  و  $Y_s$  به ترتیب عملکرد دانه‌ی هر لاین  $F_5$  در شرایط تنش خشکی و شرایط نرمال و  $\bar{Y}_s$  و  $\bar{Y}_p$  به ترتیب میانگین عملکرد دانه‌ی تمامی فامیل‌های  $F_5$  در شرایط تنش خشکی و نرمال می‌باشند.

استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان با استفاده از روش تغییر یافته CTAB (Murray and Thompson, 1980) انجام شد. مجموعه‌ای از ۵۵۰ نشانگر ریزماهواره که به خوبی روی ۱۲ کروموزوم برنج توزیع شده بودند، از پایگاه اطلاعاتی گرامینه ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)) شناسایی شدند و برای بررسی چندشکلی روی والدین مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از شناسایی نشانگرهای چند شکل، کلیه لاین‌های  $F_5$  تعیین ژنوتیپ شدند و سپس نقشه پیوستگی بر اساس نقشه‌های مک‌کوش و تیمنیخ (Temnykh *et al.*, 2000, 2001; McCouch *et al.*, 2002) تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با روش مک‌فرسون و مولر (McPherson and Møller, 2006) با اندکی تغییرات انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دستگاه ترموسایکلر ASTEC-PC818 در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط چهار نوکلئوتید (۲ میلی‌مولار)، ۰/۱۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (10x) و ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. تمامی مواد واکنش به غیر از DNA الگو برای تعداد ۹۶ واکنش تهیه و در پلیت PCR ۹۶ خانه‌ای پخش شد و سپس ۲ میکرولیتر DNA الگو به هر خانه پلیت اضافه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شرایط دمایی بهینه شده شامل پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی اولیه DNA الگو و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی DNA الگو، ۴۵ ثانیه در ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد (بر حسب دمایی اتصال آغازگر مورد استفاده) برای اتصال آغازگر و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای حرکت و بسط آغازگر روی رشته‌های

DNA الگو و در انتهای برنامه پس از اتمام ۳۵ چرخه فوق، پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی آغازگر انجام شد. روش AFLP با ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی در هر واکنش انجام شد. هضم آنزیمی، اتصال سازگارها، تکثیر پیش از مرحله انتخاب و تکثیر انتخابی همانند روش وس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) با تغییرات اندکی انجام شد. هضم DNA الگو با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* انجام شد. مرحله پیش تکثیر DNA الگو با آغازگرهای بدون باز اضافی و مرحله تکثیر انتخابی با اضافه کردن سه باز اضافی به انتهای ۳ آغازگرها انجام شد. برنامه دمایی هر دو مرحله پیش تکثیر و تکثیر انتخابی به صورت سه دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته سازی اولیه DNA الگو و به دنبال آن ۱۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد (با کاهش یک درجه سانتی‌گراد در هر چرخه) و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۲۳ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از اتمام ۲۳ چرخه فوق، نمونه‌ها پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا بسط نهایی انجام شود. نشانگرهای AFLP با نام آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* مربوطه مورد استفاده در تکثیر انتخابی و به دنبال آن سایز آلی بر طبق روش استاندارد نامگذاری آغازگرهای AFLP (Vuylsteke *et al.*, 1999) انجام شد. همه محصولات PCR روی ژل‌های پلی‌اکریل‌امید ۶ درصد واسرشته‌ساز جداسازی و با روش رنگ‌آمیزی تغییر یافته نیترا نقره (An *et al.*, 2009) شناسایی شدند.

تعداد ۵۵۰ نشانگر ریزماهواره در والدین مورد ارزیابی قرار گرفت که از این تعداد ۱۳۱ نشانگر الگوی نواربندی متفاوتی بین دو والد نشان دادند که برای تجزیه QTL مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، ده ترکیب مختلف از آغازگرهای AFLP مربوط به آنزیم‌های *EcoRI* و *MseI* مورد ارزیابی قرار گرفتند که پنج ترکیب آغازگری انتخاب شد. با استفاده از این پنج ترکیب آغازگری، ۵۲ نوار چندشکل در بین والدین مشاهده شد. به این ترتیب، ۱۸۳ نشانگر چندشکل بر اساس اطلاعات حاصل از ۱۵۰ فامیل

حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در شکل ۱ ارایه شده است. ناحیه اول بای پلات که ارزش مثبت مؤلفه‌های اول و دوم را دارند، برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل مناسب می‌باشند. بر این اساس، شاخص‌هایی که در ناحیه اول قرار دارند و همچنین بر اساس همبستگی بالا و مثبت این شاخص‌ها با عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش (جدول ۲)، چهار شاخص میانگین هندسی بهره‌وری، میانگین هارمونیک، میانگین بهره‌وری و شاخص تحمل به تنش به عنوان شاخص‌های مناسب برای شناسایی ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در شرایط تحت تنش خشکی انتخاب شدند. صفایی چایی‌کار و همکاران (Safaei Chaeikar *et al.*, 2008) با بررسی ۴۹ ژنوتیپ ایرانی و خارجی در دو محیط تحت تنش خشکی و آبیاری نرمال نشان دادند که شاخص‌های MP، GMP، HM و STI همبستگی مثبت و معنی‌داری را با عملکرد در هر دو شرایط تحت تنش و بدون تنش داشتند و به عنوان شاخص‌های مناسب جهت گزینش ارقام پرمحصول در هر دو محیط تحت تنش و بدون تنش شناسایی شدند که مشابه با نتایج این پژوهش بود. ابرشهر و همکاران (Abarshahr *et al.*, 2011) نیز همانند تحقیق حاضر این چهار شاخص را به عنوان شاخص‌های مناسب برای شناسایی ژنوتیپ‌های برتر گزارش کردند. همچنین با بررسی کاهش صفات در دو شرایط نرمال و تحت تنش خشکی مشخص شد که رقم سپیدرود کاهش بیشتری در اکثر صفات و به خصوص عملکرد دانه، تعداد دانه پر و وزن هزار دانه نسبت به رقم غریب داشت و از این‌رو رقم غریب به عنوان رقم متحمل تایید شد.

با توجه به نتایج فوق، شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده این شاخص‌ها می‌تواند برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و انتخاب به کمک نشانگر مناسب باشد. از طرف دیگر، وجود همبستگی معنی‌دار بین این شاخص‌ها (جدول ۲) می‌تواند به دلیل اثرات پلیوتروپیک ژن‌ها یا QTL‌های یکسان کنترل‌کننده آن‌ها باشد. بنابراین برای درک بهتر مکان‌های ژنی کنترل‌کننده این شاخص‌ها از روش مکان‌یابی چند صفتی برای شناسایی QTL‌های آن‌ها استفاده شد.

F<sub>5</sub> جهت تهیه نقشه‌ی پیوستگی جمعیت مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل این‌که نسل F<sub>5</sub> نسل تقریباً خالصی است، از این‌رو قبل از تهیه نقشه پیوستگی نسبت‌های ژنوتیپی مورد انتظار برای نشانگرهای SSR و AFLP (۱:۱) آزمون شد. آزمون کای اسکور ( $\chi^2$ ) برای تفرق ژنوتیپ‌های نشانگر از نسبت مورد انتظار (۱:۱) برای نشانگرهای SSR و AFLP و همچنین ایجاد گروه‌های پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) با حداقل LOD برابر ۴ انجام شد. فواصل نشانگری در این نقشه نیز بر اساس تابع کوزامبی (Kosambi, 1943) محاسبه شدند. به منظور تعیین تعداد گروه‌های شاخص‌های تحمل به خشکی از تجزیه بای پلات استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه بای پلات و همبستگی بین شاخص‌ها، سه گروه برای شاخص‌ها مشخص شد و سپس مکان‌یابی چندصفتی QTL‌ها برای بهترین گروه شاخص‌ها با نرم‌افزار GenStat 14 (Payne *et al.*, 2011) انجام شد. برای نامگذاری QTL‌ها نیز از روش نام‌گذاری استاندارد (McCouch and CGSNL Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, Rice Genetics Cooperative), 2008) استفاده شد.

## نتایج و بحث

### تجزیه بای پلات

نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی شاخص‌های مختلف تحمل به خشکی نشان داد که دو مؤلفه اصلی اول و دوم به ترتیب ۸۱/۳۹ درصد و ۱۸/۲۶ درصد از کل تنوع بین فامیل‌ها را توجیه نمودند (جدول ۱). مؤلفه اول همبستگی مثبت و معنی‌دار با شاخص‌های میانگین هندسی بهره‌وری، میانگین هارمونیک، میانگین بهره‌وری و شاخص تحمل به تنش و همبستگی منفی با شاخص حساسیت به تنش و شاخص تحمل داشت و به عنوان مؤلفه تحمل به تنش خشکی نامیده شد. مؤلفه دوم همبستگی بالا و مثبت با شاخص‌های حساسیت به تنش، شاخص تحمل و عملکرد در شرایط نرمال و همبستگی منفی با سایر شاخص‌ها داشت و به عنوان مؤلفه حساسیت نامیده شد. نمودار بای پلات مشتق از مؤلفه‌های اول و دوم

جدول ۱- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای عملکرد و شاخص‌های تحمل به خشکی در شرایط نرمال و تنش  
Table 1. Principal component analysis for yield and drought tolerant indices in normal and stress conditions

شاخص‌ها Indices	مؤلفه‌ی اول PC1	مؤلفه‌ی دوم PC2
عملکرد دانه در شرایط نرمال Grain Yield in normal (GYn)	0.273	0.463
عملکرد دانه در شرایط تنش Grain Yield in stress (GYs)	0.350	-0.014
میانگین بهره‌وری Mean productivity (MP)	0.334	0.225
میانگین هندسی بهره‌وری Geometric mean productivity (GMP)	0.343	0.149
میانگین هارمونیک Harmonic mean (HM)	0.348	0.088
شاخص تحمل Tolerance index (TOL)	-0.160	0.655
شاخص حساسیت به تنش Stress susceptibility index (SSI)	-0.306	0.356
شاخص تحمل به تنش Stress tolerance index (STI)	0.342	0.146
شاخص عملکرد Yield index (YI)	0.350	-0.014
شاخص پایداری عملکرد Yield stability index (YSI)	0.306	-0.356
مقادیر ویژه Eigenvalues	8.139	1.826
درصد واریانس Variance (%)	%81.39	%18.26
درصد واریانس تجمعی Cumulative variance (%)	%81.39	%99.65

جدول ۲- همبستگی فنوتیپی شاخص‌های تحمل به خشکی در جمعیت F<sub>5</sub> برنج  
Table 2. Phenotypic correlation of drought tolerant indices in an F<sub>5</sub> rice population

شاخص‌ها Indices <sup>a</sup>	GYn	GYs	MP	GMP	HM	TOL	SSI	STI	YI	YSI
GYn	1	0.77**	0.93**	0.89**	0.85**	0.20*	-0.38**	0.88**	0.77**	0.38**
GYs		1	0.95**	0.98**	0.99**	-0.48**	-0.88**	0.97**	1**	0.88**
MP			1	0.99**	0.98**	-0.17*	-0.69**	0.99**	0.95**	0.69**
GMP				1	0.99**	-0.27**	-0.76**	0.99**	0.98**	0.76**
HM					1	-0.35**	-0.81**	0.99**	0.99**	0.81**
TOL						1	0.82**	-0.28**	-0.48**	-0.82**
SSI							1	-0.75**	-0.88**	-1**
STI								1	0.97**	0.75**
YI									1	0.88**
YSI										1

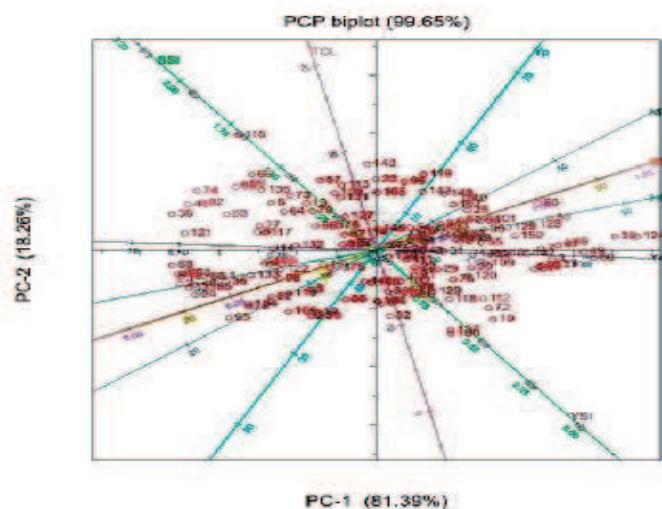
<sup>a</sup> Index abbreviations are shown in Table 1.

<sup>a</sup> اسامی شاخص‌ها در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.





شکل ۱- نمودار بای پلات شاخص‌های تحمل به خشکی بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی.  
Figure 1. Biplot diagram of drought tolerant indices based on principal component analysis.

شناسایی QTLها استفاده نمود (Zhang *et al.*, 2010). علاوه بر آن، در اغلب موارد فقط یک عامل گامتی در ناحیه ژنومی مورد نظر انحراف دارد که نمی‌تواند تأثیر معنی‌داری روی تخمین نوترکیبی بین سایر نشانگرها داشته باشد و بنابراین می‌توان از آن‌ها در تهیه نقشه استفاده نمود (Lu *et al.*, 2002). بعد از تعیین ژنوتیپ ۱۵۰ فامیل  $F_5$ ، با استفاده از تعداد ۱۸۳ نشانگر چند شکل SSR و AFLP، نقشه‌ی پیوستگی جمعیت به کمک نرم‌افزار JoinMap تهیه شد و نشانگرها به دوازده گروه پیوستگی معادل با دوازده کروموزوم برنج تفکیک شدند (شکل ۲). طول نقشه حاصل بر اساس تابع کوزامبی، ۱۰۶۳/۱۴ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله بین نشانگرهای مجاور ۵/۸۱ سانتی‌مورگان بود. برای تجزیه ژنتیکی شاخص‌های مورد مطالعه، ابتدا QTLهای این شاخص‌ها به روش تجزیه تک صفتی شناسایی شد. مقدار LOD، جهت و مقدار اثر افزایشی و درصد تغییرات فنوتیپی QTLها در جدول ۳ نشان داده شده است. در کل یازده QTL برای شاخص‌های میانگین هندسی بهره‌وری، میانگین هارمونیک، شاخص بهره‌وری متوسط و شاخص تحمل تنش روی کروموزوم‌های ۱، ۷ و ۱۱ شناسایی شدند (جدول ۳ و شکل ۲). اگرچه مطالعه برای بعضی شاخص‌های تحمل به تنش در گیاهان دیگر انجام شده است (Dashti *et al.*, 2007; Kirigwi *et al.*،

### نقشه پیوستگی و تجزیه QTL

به دلیل این‌که نسل  $F_5$  نسل تقریباً خالصی است، از این‌رو قبل از تهیه نقشه پیوستگی نسبت‌های ژنوتیپی مورد انتظار برای نشانگرهای SSR و AFLP (۱:۱) آزمون شد. برای بیشتر نشانگرهای ریزماهواره، چنانکه مورد انتظار بود، افراد هتروزیگوت نیز در جمعیت مشاهده شدند و بنابراین به منظور بررسی انحراف فراوانی‌های ژنوتیپی نشانگرها از فراوانی مورد انتظار مندلی، آزمون کای اسکور ( $\chi^2$ ) برای نشانگرهای ریزماهواره و AFLP انجام شد. نتایج نشان داد که ۱۷۵ نشانگر (۹۵.۲ درصد) مطابقت خوبی با نسبت‌های مورد انتظار داشتند و فقط هشت نشانگر (۴.۳۷ درصد) دارای فراوانی ژنوتیپی متفاوت و معنی‌داری از فراوانی مورد انتظار ۱:۱ بودند. همه این هشت نشانگر روی چهار کروموزوم متفاوت برنج قرار داشتند. از آنجایی که نشانگرهای دارای عدم تعادل به نواحی خاصی از ژنوم برنج متعلق بودند، این نتیجه را به یکی از ویژگی‌های آن نواحی از ژنوم در نقشه جمعیت حاصل نسبت داده و برای تهیه نقشه از این نشانگرها استفاده شد (Liu, 1998). همچنین پیشنهاد شده است که برای اینکه چنین انحراف‌های ژنوتیپی تولید QTLهای دروغین نکنند و تأثیری روی موقعیت و اثر QTLها نداشته باشند، اگر این انحراف‌ها خیلی شدید نباشند، می‌توان از آن‌ها در تهیه نقشه و

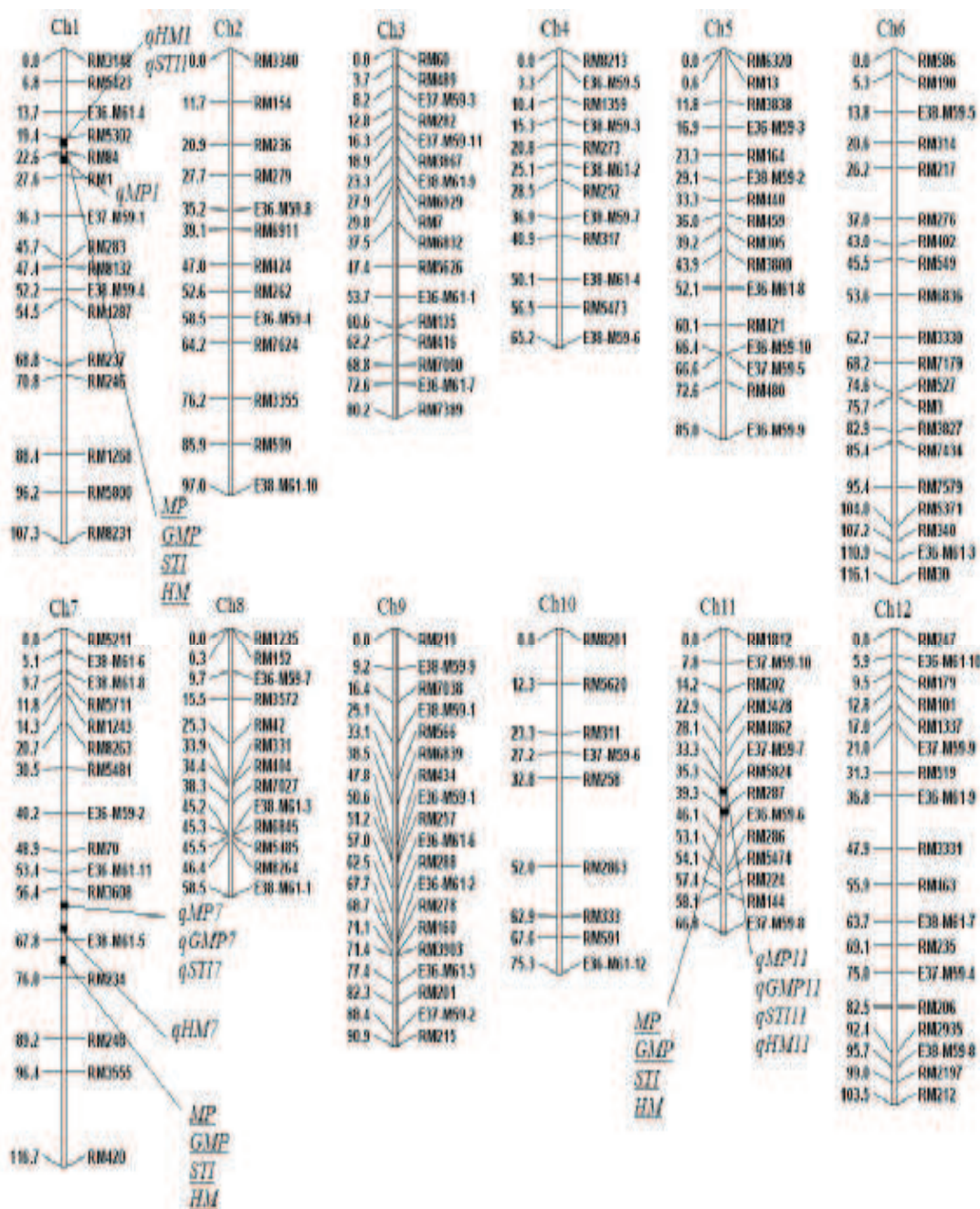
همکاران (Wu *et al.*, 1999) از روش حداقل مربعات چندصفتی برای شناسایی QTL‌های صفات ECA و EIA در زمان‌های مختلف پنجه‌زنی در یک جمعیت اینبرد لاین نوترکیب برنج استفاده کردند. نتایج نشان داد که بعضی از QTL‌های شناسایی شده در تجزیه چندصفتی هر دو صفت را کنترل می‌نماید. همچنین یان و همکاران (Yan *et al.*, 2011) یک QTL بزرگ اثر را در برنج شناسایی نمودند که نقش پلیوتروپیک دارد. و صفات تاریخ رسیدگی و ارتفاع بوته را کنترل می‌نماید. به علاوه، کای و همکاران (Cai *et al.*, 2012) مکان *qHY-8* را شناسایی و مکان‌یابی نمودند که نقشی پلیوتروپیک در کنترل صفات تاریخ رسیدگی و اجزای عملکرد داشت. علاوه بر آن در گیاهان دیگر نیز از روش مکان‌یابی چند صفتی برای شناسایی QTL‌ها استفاده شده است. به عنوان مثال، لی و همکاران (Li *et al.*, 2007) ناحیه ژنومی را شناسایی کردند که چندین صفت مرتبط به ارتفاع بوته را در ذرت کنترل می‌کند. همچنین سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2012) با روش مکان‌یابی چند صفتی، یک ناحیه‌ی کروموزومی که کنترل چند صفت مقاومت به بیماری را در گندم به عهده داشت، شناسایی نمودند.

تمامی QTL‌های شناسایی شده در روش چند صفتی، اثر متقابل QTL×شاخص را نشان دادند (جدول ۴) که نشان‌دهنده این است که این QTL علاوه بر خود شاخص، در کنترل شاخص‌های دیگر نیز تأثیر دارد و اثرات پلیوتروپیک دارند. بنابراین می‌توان از این اطلاعات برای بهبود همزمان صفات همبسته و انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود. موقعیت QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌ها در این مطالعه روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ به ترتیب ۷۱/۹۱ و ۳۹/۳۳ سانتی‌مورگان بود که با موقعیت QTL‌های شناسایی شده برای این شاخص‌ها در روش تک صفتی متفاوت بود. در هر سه QTL شناسایی شده، علامت اثر افزایشی QTL‌های شناسایی شده برای این چهار شاخص یکسان بود (جدول ۴) که به دلیل وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار این شاخص‌ها بود (جدول ۲). شناسایی QTL برای شاخص‌ها می‌تواند در شناسایی مکان‌های ژنی که عملکرد را در دو محیط متفاوت کنترل می‌نماید، کمک نماید. چون این شاخص‌ها می‌توانند ژنوتیپ‌های مقاوم را

اما تنها (2007; Guo *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009) در یک تحقیق که با استفاده از ۲۱۳ نشانگر ریزماهوره در ۱۹۵ لاین اینبرد برنج انجام شد، چهار QTL برای شاخص مقاومت به خشکی (Drought Resistance Index) یا شاخص پایداری عملکرد (Yield Stability Index) روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۹ شناسایی شد که به ترتیب ۱۹/۷۹، ۹/۴۳، ۷/۸۳ و ۶/۸۲ درصد از واریانس فنوتیپی را توجیه نمودند (Hu *et al.*, 2007). اثر افزایشی این QTL‌ها بین ۰/۱۱ تا ۴/۵۲ گرم در متر مربع و LOD آن‌ها نیز بین ۲/۸۷ تا ۴/۱۳ متغیر بود. در QTL‌های *qMP11*، *qGMP11*، *qHM11* و *qST11* آلل‌های افزایشنده از والد سپیدرود به نتاج انتقال یافت، در حالی که در بقیه QTL‌ها آلل‌های افزایشنده از والد غریب به نتاج منتقل شد. موقعیت QTL‌های شناسایی شده برای این شاخص‌ها روی کروموزوم ۱۱ یکسان بود. در حالی که موقعیت QTL‌های شناسایی شده روی دو کروموزوم ۱ و ۷ برای بعضی شاخص‌ها یکسان و برای بعضی دیگر متفاوت بود. مشابه و یکسان بودن موقعیت QTL‌ها روی نقشه پیوستگی می‌تواند به دلیل اثرات پلیوتروپیک و یا پیوستگی نزدیک این QTL‌ها باشد.

برای مشخص شدن این اثرات از مکان‌یابی چند صفتی استفاده و نتایج در جدول ۴ ارائه شد. در کل سه QTL روی کروموزوم‌های ۱، ۷ و ۱۱ شناسایی شدند که هر چهار شاخص را کنترل کردند و اثرات پلیوتروپیک داشتند (شکل ۲). اثر افزایشی این QTL‌ها بین ۰/۱۰ تا ۳/۶۴ گرم در متر مربع متغیر بود (جدول ۳). موقعیت QTL شناسایی شده روی کروموزوم ۱ در فاصله ۱۹/۴۸ سانتی مورگانی از ابتدای کروموزوم بود که با موقعیت QTL‌های شناسایی شده برای شاخص‌های میانگین هارمونیک و شاخص تحمل تنش به صورت تک صفتی یکسان و با شاخص بهره‌وری متوسط متفاوت بود. در روش تجزیه تک صفتی، هیچ یک از نواحی ژنومی کروموزوم ۱ کنترل شاخص میانگین هندسی بهره‌وری را کنترل نکردند، در حالی که در روش چند صفتی روی این کروموزوم یک QTL پلیوتروپیک کنترل‌کننده‌ی این شاخص شناسایی شد که نشان‌دهنده دقت و قدرت بیشتر روش چندصفتی نسبت به تک صفتی است. مکان‌یابی چند صفتی قبلاً بررسی شده است. وو و





شکل ۲- QTL های شناسایی شده برای شاخص های تحمل به خشکی به روش تک صفتی و چند صفتی در جمعیت F<sub>5</sub> برنج. QTL های بدون خط زیر و دارای خط زیر به ترتیب QTL های روش تک صفتی و چند صفتی را نشان می دهند.

Figure 2. QTLs Identified for drought tolerant indices based on single and multiple trait in rice F<sub>5</sub> population. QTLs without underline and with underline showed QTLs of single and multiple trait methods, respectively

جدول ۳- مکان‌یابی تک صفتی QTL‌ها برای شاخص‌های تحمل به خشکی در برنج

Table 3. Single trait mapping of QTLs for drought tolerant indices in rice

شاخص Index	QTL	کروموزوم Chromosome	موقعیت <sup>a</sup> Position <sup>a</sup>	LOD	اثر افزایشی <sup>b</sup> Additive effect <sup>b</sup>	درصد واریانس <sup>c</sup> Variance (%) <sup>c</sup>
میانگین بهره‌وری Mean productivity (MP)	<i>qMP1</i>	1	22.64	2.69	-2.85	6
	<i>qMP7</i>	7	60.26	3	-3.29	8.07
	<i>qMP11</i>	11	35.33	4.13	3.68	9.89
میانگین هندسی بهره‌وری Geometric mean productivity (GMP)	<i>qGMP7</i>	7	60.26	3.25	-3.93	9.43
	<i>qGMP11</i>	11	35.33	3.19	3.54	7.65
شاخص میانگین هارمونیک Harmonic mean (HM)	<i>qHMI</i>	1	19.48	3.05	-3.53	6.79
	<i>qHM7</i>	7	64.04	3.92	-4.52	11.13
	<i>qHM11</i>	11	35.33	3.35	3.73	7.59
تحمل تنش Stress tolerance index (STI)	<i>qSTI1</i>	1	19.48	2.87	-0.11	6.37
	<i>qSTI7</i>	7	60.26	3.65	-0.14	10.26
	<i>qSTI11</i>	11	35.33	3.29	0.12	7.51

<sup>a</sup> موقعیت QTL شناسایی شده از ابتدای کروموزوم.

<sup>b</sup> اثر افزایشی، اثر جایگزینی یک آلل والد غریب به وسیله یک آلل والد سپیدرود می‌باشد. ارزش مثبت نشان دهنده این است که والد سپیدرود آلل مثبت دارد و ارزش منفی عکس آن است.

<sup>c</sup> واریانس فنوتیپی قابل توجه توسط هر QTL.

<sup>a</sup> Position of identified QTL from beginning of the chromosome.

<sup>b</sup> Additive effect is the effect of substituting a Gharib allele by a Sepidroud allele. Positive values indicates that Sepidroud has the positive allele; and the case of negative values is just the opposite.

<sup>c</sup> Variation explained by each putative QTL.

جدول ۴- مکان‌یابی چند صفتی QTL‌ها برای شاخص‌های تحمل به خشکی در برنج

Table 4. Multi-trait mapping of QTLs for drought tolerance indices in rice

شاخص <sup>a</sup> Index <sup>a</sup>	کروموزوم Chromosome	موقعیت <sup>b</sup> Position <sup>a</sup>	LOD	اثر افزایشی <sup>c</sup> Additive effect <sup>b</sup>	سطح معنی‌داری Significant level	درصد واریانس <sup>d</sup> Variance (%) <sup>c</sup>	QTL×شاخص QTL×Index
GMP	1	19.48	3.19	-3.36	0.001	6.9	Yes
HM	1	19.48	3.19	-3.69	0.001	7.4	Yes
MP	1	19.48	3.19	-2.97	0.001	6.5	Yes
STI	1	19.48	3.19	-0.12	0.001	6.8	Yes
GMP	7	71.91	4.33	-3.44	0.002	6.9	Yes
HM	7	71.91	4.33	-3.92	0.001	7.4	Yes
MP	7	71.91	4.33	-2.84	0.004	6.5	Yes
STI	7	71.91	4.33	-0.12	0.001	6.8	Yes
GMP	11	39.33	2.82	3.20	0.002	6.9	Yes
HM	11	39.33	2.82	3.19	0.003	7.4	Yes
MP	11	39.33	2.82	3.08	0.001	6.5	Yes
STI	11	39.33	2.82	0.10	0.006	6.8	Yes

<sup>a</sup> اسامی شاخص‌ها در جدول ۱ ارایه شده‌اند.

<sup>b</sup> موقعیت QTL شناسایی شده از ابتدای کروموزوم.

<sup>c</sup> اثر افزایشی، اثر جایگزینی یک آلل والد غریب به وسیله یک آلل والد سپیدرود می‌باشد. ارزش مثبت نشان دهنده این است که والد سپیدرود آلل مثبت دارد و ارزش منفی عکس آن است.

<sup>d</sup> واریانس فنوتیپی قابل توجه توسط هر QTL.

<sup>a</sup> Index abbreviations are shown in Table 1.

<sup>b</sup> Position of identified QTL from beginning of the chromosome.

<sup>c</sup> Additive effect is the effect of substituting a Gharib allele by a Sepidroud allele. Positive values indicates that Sepidroud has the positive allele; and the case of negative values is just the opposite.

<sup>d</sup> Variation explained by each putative QTL.

همبستگی‌های متفاوت در سطوح مولکولی می‌توان در برنامه اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر و همچنین بهبود همزمان صفات همبسته گامی موثر برداشت.

#### سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شده است. نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان و مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور برای اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

تشخیص دهند. بنابراین با شناسایی QTL های آن‌ها می‌توان در بهبود ارقام مقاوم به تنش با استفاده از برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر بهره جست. همچنین محققین زیادی (Jiang and Zeng, 1995; Knott and Haley, 2000; Hackett *et al.*, 2001; Gilbert and Roy, 2003; Li *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2010) نشان دادند که مکان‌یابی چند صفتی می‌تواند قدرت بیشتری در شناسایی QTL داشته باشد، چرا که اطلاعات صفات همبسته می‌تواند خطای واریانس را کاهش دهد. همچنین موقعیت QTL ها دقیق‌تر و بهتر مکان‌یابی می‌شود. بنابراین با مطالعه مکان‌یابی چند صفتی و شناسایی تعداد بیشتر QTL ها و همچنین ارزیابی روابط ژنتیکی بین صفات با

#### References

- Abarshahr, M., Rabiei, B. and Samizadeh-Lahigi, H. 2011.** Assessing genetic diversity of rice varieties under drought stress conditions. *Notulae Scientia Biologicae* 3: 114-123.
- An, Z. W., Xie, L. L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X. G. and Huang, H. S. 2009.** A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391: 77-79.
- Banerjee, S., Yandell, B. S. and Yi, N. 2008.** Bayesian quantitative trait loci mapping for multiple traits. *Genetics* 179: 2275-2289.
- Bouman, B. A. M. and Tuong, T. P. 2001.** Field water management to save water and increase its productivity in irrigated lowland rice. *Agricultural Water Management* 49: 11-30.
- Bousslama, M. S. and Schapaugh, W. T. 1984.** Stress Tolerance in soybeans. I. evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science* 24: 933.
- Cai, H. Y., Diao, S., He, Y. G., Zhang, L. P., Liu, S. J., Zhu, Y. G. and Zhang, Z. H. 2012.** Genetic and physical mapping of *qHY-8*, a pleiotropic QTL for heading date and yield-related traits in rice. *Euphytica* 184: 109-118.
- Dashti, H., Yazdi-Samadi, B., Ghannadha, M., Naghavi, M. and Quarri, S. 2007.** QTL analysis for drought resistance in wheat using doubled haploid lines. *International Journal of Agriculture and Biology* 9: 98-101.
- Du, W., Wang, M., Fu, S. and Yu, D. 2009.** Mapping QTLs for seed yield and drought susceptibility index in soybean (*Glycine max* L.) across different environments. *Journal of Genetics and Genomics* 36: 721-731.
- E Silva, L. D. C., Wang, S. and Zeng, Z. B. 2012.** Multiple trait multiple interval mapping of quantitative trait loci from inbred line crosses. *BMC Genetics* 13: 67.
- Fang, M., Jiang, D., Pu, L. J., Gao, H. J., Ji, P., Wang, H. Y. and Yang, R. Q. 2008.** Multitrait analysis of quantitative trait loci using Bayesian composite space approach. *BMC Genetics* 9: 48.
- Fernandez, G. C. J. 1992.** Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: Kuo, C. G. (Ed.), *Adaptation of vegetables and other food crops in temperature and water stress*. AVRDC Staff Publication, Shanhu. pp: 257-270.
- Fischer, R. A. and Maurer, R. 1978.** Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research* 29: 897-912.

- Gavuzzi, P., Rizza, F., Palumbo, M., Campanile, R. G., Ricciardi, G. L. and Borghi, B. 1997.** Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals. **Canadian Journal of Plant Science** 77: 523-531.
- Gilbert, H. and Roy, P. L. 2003.** Comparison of three multitrait methods for QTL detection. **Genetics Selection Evolution** 35: 281-304.
- Guo, J., Su, G., Zhang, J. and Wang, G. 2008.** Genetic analysis and QTL mapping of maize yield and associate agronomic traits under semi-arid land condition. **African Journal of Biotechnology** 7: 1829-1838.
- Hackett, C., Meyer, R. and Thomas, W. 2001.** Multi-trait QTL mapping in barley using multivariate regression. **Genetical Research** 77: 95-106.
- Hossain, A. B. S., Sears, R. G., Cox, T. S. and Paulsen, G. M. 1990.** Desiccation tolerance and its relationship to assimilate partitioning in winter wheat. **Crop Science** 30: 622-627.
- Hu, S. P., Yang, H., Zou, G. H., Liu, H. Y., Liu, G. L., Mei, H. W., Cai, R., Li, M. S. and Luo, L. J. 2007.** Relationship between coleoptile length and drought resistance and their QTL mapping in Rice. **Rice Science** 14: 13-20.
- Jiang, C. and Zeng, Z. B. 1995.** Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics** 140: 1111-1127.
- Khush, G. S. 2005.** What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology** 59: 1-6.
- Kirigwi, F., Van Ginkel, M., Brown-Guedira, G., Gill, B., Paulsen, G. and Fritz, A. 2007.** Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. **Molecular Breeding** 20: 401-413.
- Knott, S.A. and Haley, C.S. 2000.** Multitrait least squares for quantitative trait loci detection. **Genetics** 156 (2): 899-911.
- Korol, A. B., Ronin, Y. I., Itskovich, A. M., Peng, J. and Nevo, E. 2001.** Enhanced efficiency of quantitative trait loci mapping analysis based on multivariate complexes of quantitative traits. **Genetics** 157: 1789-1803.
- Kosambi, D. D. 1943.** The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Human Genetics** 12: 172-175.
- Lafitte, H. R., Yongsheng, G., Yan, S. and Li, Z. K. 2007.** Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. **Journal of Experimental Botany** 58: 169-175.
- Li, R., Tsaih, S. W., Shockley, K., Stylianou, I. M., Wergedal, J., Paigen, B. and Churchill, G. A. 2006.** Structural model analysis of multiple quantitative traits. **PLoS Genetics** 2: e114.
- Li, Y., Dong, Y., Niu, S. and Cui, D. 2007.** The genetic relationship among plant-height traits found using multiple-trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. **Genome** 50: 357-364.
- Liu, B. H. 1998.** Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis, CRC Press.
- Lu, H., Romero-Severson, J. and Bernardo, R. 2002.** Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 105: 622-628.



- Malosetti, M., Ribaut, J. M., Vargas, M., Crossa, J., Boer, M. and Van Eeuwijk, F. 2007.** Multi-trait multi-environment QTL modelling for drought-stress adaptation in maize. In: Spiertz, J. H. J., Struik, P. C. and Van Laar, H. H. (Eds.), *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene-Plant-Crop Relations*. Springer, pp: 23-34.
- Malosetti, M., Ribaut, J. M., Vargas, M., Crossa, J. and van Eeuwijk, F. A. 2008.** A multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 161: 241-257.
- McCouch, S. R. and CGSNL (Committee on Gene Symbolization, Nomenclature and Linkage, Rice Genetics Cooperative). 2008.** Gene nomenclature system for rice. *Rice* 1: 72-84.
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y. B., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. K., Xing, Y. Z., Zhang, Q. F., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. 2002.** Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 199-207.
- McPherson, M. J. and Møller, S. G. 2006.** PCR. Taylor & Francis Group.
- Mi, X., Eskridge, K., Wang, D., Baenziger, P. S., Campbell, B. T., Gill, K. S., Dweikat, I. and Bovaird, J. 2010.** Regression-based multi-trait QTL mapping using a structural equation model. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 9: Art. 38.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.
- Payne, R. W., Murray, D. A., Harding, S. A., Baird, D. B. and Soutar, D. M. 2011.** An Introduction to GenStat for Windows (14<sup>th</sup> Edition). VSN International, Hemel Hempstead, UK.
- Rabiei, B. and Sabouri, H. 2009.** Mapping genes controlling quantitative traits. University of Guilan Press. (In Persian)
- Rosielle, A. A. and Hamblin, J. 1981.** Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Science* 21: 943-946.
- Safaei Chaeikar, S., Rabiei, B., Samizadeh, H. A. and Esfahani, M. 2008.** Evaluation of tolerance to terminal drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences* 9: 315-331. (In Persian)
- SES. 2002.** Standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute Manila, Philippines.
- Singh, S., Hernandez, M. V., Crossa, J., Singh, P. K., Bains, N. S., Singh, K. and Sharma, I. 2012.** Multi-trait and multi-environment QTL analyses for resistance to wheat diseases. *PloS one* 7: e38008.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S. and McCouch, S. 2001.** Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research* 11: 1441-1452.
- Temnykh, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y. G., Ishii, T. and McCouch, S. R. 2000.** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 697-712.

- Van Ooijen, J. 2006.** JoinMap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van De Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Vuylsteke, M., Mank, R., Antonise, R., Bastiaans, E., Senior, M., Stuber, C., Melchinger, A., Lübberstedt, T., Xia, X. and Stam, P. 1999.** Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: Analysis of distribution of AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 921-935.
- Wu, W. R., Li, W. M., Tang, D. Z., Lu, H. R. and Worland, A. 1999.** Time-related mapping of quantitative trait loci underlying tiller number in rice. *Genetics* 151: 297-303.
- Xu, C., Wang, X., Li, Z. and Xu, S. 2008.** Mapping QTL for multiple traits using Bayesian statistics. *Genetical Research* 90: 15.
- Yan, W. H., Wang, P., Chen, H. X., Zhou, H. J., Li, Q. P., Wang, C. R., Ding, Z. H., Zhang, Y. S., Yu, S. B. and Xing, Y. Z. 2011.** A major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Molecular plant* 4: 319-330.
- Zhang, L., Wang, S., Li, H., Deng, Q., Zheng, A., Li, S., Li, P., Li, Z. and Wang, J. 2010.** Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1071-1082.



## Multi-trait mapping of QTLs for drought tolerance indices in rice

Mehdi Rahimi<sup>1</sup>, Hamid Dehghani<sup>2\*</sup>, Babak Rabiei<sup>3</sup> and Alireeza Tarang<sup>4</sup>

1 and 2. Ph. D. Student and Assoc. Prof., respectively, Dept. of Plant Breeding, Tarbiat Modarres University, 3. Assoc. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan, 4. Assist. Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of North of Iran

(Received: August 5, 2012- Accepted: December 10, 2012)

---

### Abstract

Rice improvement for drought tolerance requires reliable assessment of diversity and genetic analysis of drought tolerance related indices in breeding populations. In this study, 150 F<sub>5</sub> families derived from a cross between Sepidroud (*Indica*) and Gharib (*Indica*) varieties were evaluated to multi-trait mapping of genomic regions controlling drought tolerance indices in normal and drought stress conditions. Results of biplot analysis showed that stress tolerance index (STI), mean productivity (MP), geometric mean productivity (GMP) and harmonic mean (HM) are suitable indices to select the high-yielding genotypes in applied rice breeding programs. QTLs mapping for each index using composite interval mapping identified three, three, two and three QTLs for HM, MP, GMP and STI, respectively, but the joint-analysis data for investigate the genetic relationships between these indices using the multi-trait mapping showed that there are significant genetic relationships between studied indices, so none of these identified QTLs didn't independently control an index and jointly controlled multiple indices. Results from current study showed that the multi-trait joint analysis not only identified additional QTLs, but also revealed the genetic relationship between different highly correlated traits at the molecular level.

**Keywords:** Drought tolerance indices, Multi-trait analysis, QTL, Rice

---

\*Corresponding author: [dehghani@modares.ac.ir](mailto:dehghani@modares.ac.ir)