

Prediction of rice seedlings' tolerance to iron toxicity using artificial intelligence, and molecular and phenotypic data

Milad Aliyani Nejad 

MSc Student, Department of Crop Production, Faculty of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran. Email address: alyaninezad.student@gonbad.ac.ir

Sayed Javad Sajadi 

*Corresponding Author: Assistant Professor, Department of Crop Production, Faculty of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran. Email address: sajadi@gonbad.ac.ir

Hossein Sabouri 

Professor, Department of Crop Production, Faculty of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran. Email address: hossein.sabouri@gonbad.ac.ir

Mehdi Zarei 

Assistant Professor, Department of Crop Production, Faculty of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran. Email address: mehdizarei@gonbad.ac.ir

Abstract

Objective

Iron toxicity is a major constraint to rice production in acidic flooded soils. Conventional methods for evaluating tolerance to this stress rely on costly and time-consuming phenotyping, which limits their efficiency in breeding programs. This study aimed to develop an efficient cross-condition prediction framework to assess rice tolerance to iron toxicity using phenotypic and genotypic data collected under both normal and stress conditions.

Materials and Methods

Phenotypic and genotypic data derived from iPBS, IRAP, ISSR, and SSR markers were collected from 96 rice inbred lines and their parents under both normal and iron-toxicity stress conditions. Following data preprocessing, including removal of missing values, outlier detection, and normalization, feature selection was performed using three algorithms: F-test, MRMR, and RReliefF. Eleven machine-learning models, including artificial neural network (ANN), support

vector machine (SVM), decision tree (DT), random forest (RF), XGBoost, AdaBoost, Gaussian process (GP), linear regression (LR), linear discriminant analysis (LDA), k-nearest neighbors (KNN), and Naive Bayes (NB), were evaluated across twelve prediction scenarios defined by data type and training–testing conditions. Model performance was assessed using MAE, RMSE, and R^2 . The dataset was split into training and test sets at a 70:30 ratio, cross-validation was applied to improve model robustness, and hyperparameters were optimized using grid search and Bayesian optimization.

Results

Prediction scenarios based on full data integration (D10 and D12) showed the highest predictive accuracy, with coefficients of determination exceeding 0.96. Scenario D8, which relied solely on genotypic data from normal conditions and MRMR-based feature selection, achieved moderate predictive accuracy ($R^2=0.678$). This result suggests that marker-derived patterns associated with genotypes' responses to iron toxicity can be partially captured from normal-condition data and used for preliminary cross-condition screening.

Conclusion

The results indicate that a stepwise prediction strategy can improve the efficiency of preliminary genotype screening for iron-toxicity tolerance. Models such as D8, despite their moderate accuracy, may help reduce costs and optimize resource allocation during early screening stages. However, final selection of tolerant genotypes still requires validation using more accurate models, direct phenotyping under stress conditions, and independent field trials.

Keywords: Rice, Iron toxicity, Machine learning, Between-condition prediction, Feature selection.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Aliyani nejad M, Sajadi SJ, Sabouri H, Zarei M (2025) Prediction of rice seedlings tolerance to iron toxicity using artificial intelligence, and molecular and phenotypic data. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 2 (3), 69-92.

Journal of Genetics and Plant Breeding 2 (3), 69-92.

DOI: 10.22103/gpb.2025.5693

Received: May 12, 2025.

Received in revised form: July 16, 2025.

Accepted: July 17, 2025.

Published online: September 25, 2025.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and Iranian Genetics Society.



© the authors

پیش‌بینی مقاومت گیاهچه‌های برنج به سمیت آهن با استفاده از هوش مصنوعی و داده‌های مولکولی و فنوتیپی

میلاد علیانی نژاد

دانشجو کارشناسی ارشد، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران. رایانامه:

alyaninezad.student@gonbad.ac.ir

سید جواد سجادی

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران. رایانامه:

sajadi@gonbad.ac.ir

حسین صبوری

استاد، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران. رایانامه:

hossein.sabouri@gonbad.ac.ir

مهدی زارعی

استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، ایران. رایانامه:

mehdizarei@gonbad.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲ تاریخ دریافت فابل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۶

چکیده

هدف: سمیت آهن یکی از تنش‌های مهم محدودکننده تولید برنج در خاک‌های غرقابی اسیدی است. روش‌های مرسوم ارزیابی تحمل به این تنش که مبتنی بر فنوتیپ‌برداری پرهزینه و زمان‌بر هستند، به‌عنوان یک محدودیت اساسی در برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شوند. این مطالعه با هدف ارائه یک چارچوب پیش‌بینی کارآمد و بین شرایطی انجام شد تا امکان ارزیابی تحمل به سمیت آهن را با استفاده از داده‌های جمع‌آوری شده در شرایط نرمال و تنش فراهم کند.

مواد و روش‌ها: برای این منظور، داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (نشانگرهای iPBS، IRAP، SSR و ISSR) مربوط به ۹۶ لاین اینبرد برنج و والدین آن‌ها، در هر دو شرایط نرمال و تنش سمیت آهن گردآوری شد. پس از پیش‌پردازش داده‌ها شامل حذف داده گمشده، تشخیص و حذف نقاط پرت و نرمال‌سازی داده‌ها، انتخاب ویژگی با سه الگوریتم شامل آزمون F، الگوریتم MRMR و الگوریتم RReliefF برای وزن‌دهی ویژگی‌ها بر اساس توانایی آن‌ها در تمایز بین نمونه‌های همسایه مورد استفاده قرار گرفت. عملکرد ده مدل یادگیری ماشین شامل شبکه عصبی مصنوعی، ماشین بردار پشتیبان، درخت تصمیم، روش‌های گروهی شامل جنگل تصادفی، XGBoost و AdaBoost، فرایند گاوسی، رگرسیون خطی، تحلیل ممیز خطی نزدیک‌ترین همسایه و Naive Bayes در دوازده حالت پیش‌بینی مدل‌سازی مختلف (مبتنی بر نوع داده و شرایط آموزش - آزمون) با معیارهای MAE، RMSE و R^2 ارزیابی شد. داده‌ها به نسبت ۷۰:۳۰ به مجموعه‌های آموزش و آزمون تقسیم شدند و به‌منظور ارزیابی پایداری مدل‌ها و جلوگیری از بیش‌برازش، از اعتبارسنجی متقاطع استفاده شد. بهینه‌سازی فرآیندها با استفاده از جستجوی شبکه‌ای و بهینه‌سازی بیزی انجام شد و ارزیابی نهایی مدل‌ها بر روی مجموعه آزمون صورت گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که حالت‌های پیش‌بینی مبتنی بر ادغام کامل داده‌ها (D10 و D12) با دستیابی به ضرایب تعیین بالا ($R^2 > 0.96$) به‌عنوان دقیق‌ترین رویکردها شناخته شدند. حالت پیش‌بینی D8 که تنها از داده‌های ژنوتیپی شرایط نرمال و الگوریتم MRMR استفاده می‌کند، با دقت متوسط ($R^2 = 0.678$) نشان داد که می‌توان برخی الگوهای آماری نشانگری مرتبط با پاسخ ژنوتیپ‌ها به سمیت آهن را در جمعیت مورد مطالعه شناسایی کرد و از آن‌ها برای غربالگری اولیه بین‌شرایطی استفاده نمود. **نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده مرحله‌ای از مدل‌ها می‌تواند در غربالگری اولیه ژنوتیپ‌ها مؤثر باشد؛ به‌طوری‌که مدل‌هایی مانند D8 با وجود دقت متوسط، می‌توانند به کاهش هزینه و تمرکز منابع در مراحل ابتدایی کمک کنند، در حالی که انتخاب نهایی ژنوتیپ‌های متحمل همچنان نیازمند اعتبارسنجی با مدل‌های دقیق‌تر، فنوتیپ‌برداری مستقیم تحت تنش و آزمون‌های مستقل مزرعه‌ای است.

کلیدواژه‌ها:

انتخاب ویژگی، برنج، پیش‌بینی بین شرایطی، سمیت آهن، یادگیری ماشین.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: علیانی‌نژاد میلاد، سجادی سیدجواد، صوری حسین، زارعی مهدی (۱۴۰۴) پیش‌بینی مقاومت گیاهچه‌های برنج به سمیت

آهن با استفاده از هوش مصنوعی و داده‌های مولکولی و فنوتیپی. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۲(۳)، ۹۲-۹۹.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society

© the authors



مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین غلات جهان و تأمین‌کننده اصلی کالری برای بیش از نیمی از جمعیت جهان، به‌ویژه در آسیا است (FAO 2021). تنش‌های غیرزنده، از جمله تنش‌های تغذیه‌ای، از موانع اصلی دستیابی به پتانسیل کامل عملکرد این محصول هستند (Dos Santos et al. 2022). آهن (Fe) با نقش حیاتی در فرآیندهایی مانند فتوسنتز و تنفس، دارای تأثیر دوگانه است (Marschner 2012). کمبود آن در خاک‌های قلیایی و آهنی باعث کلروز و کاهش رشد می‌شود (Mahender et al. 2019)، در حالی که بیش‌بود آن در شرایط غرقابی و اسیدی، منجر به سمیت و بروز علائمی مانند لکه‌های قهوه‌ای و نکروز برگ می‌گردد (Becker et al. 2005; Stein et al. 2019).

روش‌های سنتی ارزیابی تحمل به سمیت آهن که عمدتاً مبتنی بر فنوتیپ‌برداری تحت شرایط تنش هستند، معمولاً زمان‌بر، پرهزینه و وابسته به شرایط محیطی‌اند و از این‌رو به‌عنوان یک محدودیت مهم در برنامه‌های اصلاحی شناخته می‌شوند (Gill et al. 2022). در سال‌های اخیر، یادگیری ماشین با توانایی استخراج الگوهای پیچیده از داده‌های چندبعدی به‌عنوان ابزاری کارآمد در فنومیکس و ژنومیکس گیاهی مطرح شده است (Farooq et al. 2024; Danilevicz et al. 2022). مطالعات ژنتیکی پیشین، تنوع قابل توجهی را در پاسخ ژرم‌پلاسم برنج به سمیت آهن نشان داده‌اند و برخی نشانگرهای ژنتیکی با این صفت همبستگی دارند (Rajonandraina et al. 2012; Ahmed et al. 2023). باین‌حال، غربالگری ژنوتیپ‌ها بر اساس این نشانگرها معمولاً نیازمند فنوتیپ‌برداری پرهزینه تحت شرایط تنش است. به‌طور مشخص، الگوریتم‌هایی مانند جنگل تصادفی (Random Forest) و ماشین بردار پشتیبان (SVM) در پیش‌بینی صفات کمی، تحلیل وابستگی صفات و شناسایی ویژگی‌های کلیدی در گیاهان با موفقیت به‌کار رفته‌اند (Zhao et al. 2016). علاوه بر این، مدل‌های یادگیری ماشین پیچیده، شامل روش‌های غیرخطی همچون رگرسیون فرآیند گاوسی (GPR) و دیگر روش‌های یادگیری آماری، به‌طور فزاینده‌ای برای مدل‌سازی صفات فنوتیپی، تحلیل عدم قطعیت و بهبود پیش‌بینی صفات کمی در گیاهان به‌کار می‌روند (Montesinos López et al. 2022).

در مجموع، شواهد پژوهشی اخیر نشان می‌دهد که ادغام روش‌های یادگیری ماشین با داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی می‌تواند دقت پیش‌بینی صفات مرتبط با مقاومت یا حساسیت به سمیت آهن را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد. همچنین، روش‌های انتخاب ویژگی (Feature Selection) مانند حداکثر ارتباط - حداقل افزونگی (MRMR) در کاهش ابعاد داده‌های ژنوتیپی و افزایش کارایی و تفسیرپذیری مدل‌ها مؤثر بوده‌اند (Peng et al. 2005). با این حال، یک شکاف پژوهشی قابل توجه در زمینه پیش‌بینی تحمل به تنش‌ها مانند سمیت آهن باقی است. بسیاری از مطالعات برای آموزش مدل‌ها به داده‌های فنوتیپی جمع‌آوری‌شده تحت شرایط تنش متکی هستند که خود نیازمند اجرای آزمایش‌های پرهزینه و زمان‌بر است. پرسش کلیدی این است: آیا می‌توان با استفاده فقط از داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی موجود در شرایط نرمال (بدون تنش)، پاسخ گیاه به تنش آبی (سمیت آهن) را با دقت کافی

پیش‌بینی کرد. ارائه یک راه‌حل عملی برای این پرسش می‌تواند چرخه غربالگری و انتخاب در برنامه‌های اصلاح نباتات را به‌طور چشمگیری تسریع و هزینه‌بری آن را کاهش دهد. بر این اساس، اهداف اصلی این پژوهش به شرح زیر تعریف شد:

(۱) مقایسه عملکرد طبیعی از الگوریتم‌های یادگیری ماشین در پیش‌بینی تحمل گیاهچه‌های برنج به سمیت آهن،

(۲) ارزیابی قابلیت تعمیم‌پذیری و دقت پیش‌بینی بین شرایطی (از شرایط نرمال به شرایط تنش) در مدل‌های منتخب.

نوآوری این مطالعه در تمرکز بر توسعه یک چارچوب پیش‌بینی بین شرایطی است که با تلفیق سیستماتیک داده‌های مولکولی و فنوتیپی در شرایط نرمال و به‌کارگیری روش‌های بهینه انتخاب ویژگی و مدل‌سازی، امکان غربالگری اولیه ژنوتیپ‌های مستعد را پیش از اعمال تنش فراهم می‌آورد.

مواد و روش‌ها

محل اجرا، مواد گیاهی و طراحی آزمایش: این مطالعه در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس (گنبدکاووس، ایران) انجام شد. جامعه گیاهی مورد استفاده شامل ۹۶ لاین اینبرد نسل F₈ حاصل از تلاقی بین دو رقم اهلمی طارم (ATM) (متحمل به سمیت آهن) و ندا (NAD) (حساس به سمیت آهن) به همراه والدین بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار و در دو شرایط نرمال (غلظت آهن ۲ میلی‌گرم در لیتر) و تنش سمیت آهن اجرا گردید.

آماده‌سازی بذر، جوانه‌زنی و شرایط رشد: بذور تمامی ژنوتیپ‌ها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و با آب مقطر استریل شست‌وشوی کامل داده شدند. برای شکستن خواب فیزیولوژیکی، بذرها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. جوانه‌زنی در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب انجام شد. گیاهچه‌های جوانه‌زده به ظروف پلاستیکی حاوی محلول غذایی یوشیدا با نصف غلظت استاندارد منتقل شدند و پس از یک هفته سازگاری، به محلول با غلظت کامل انتقال یافتند. گیاهان در اتاقک رشد با دمای ۲۸-۲۸ درجه سلسیوس (روز) و ۲۲-۲۵ درجه سلسیوس (شب)، دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی، شدت نور ۴۰۰-۶۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد پرورش یافتند.

تهیه محلول غذایی و اعمال تنش سمیت آهن: از محلول غذایی یوشیدا (Yoshida et al. 1976) با ترکیب زیر استفاده شد:

- عناصر ماکرو: نیتروژن (۴۰ ppm از NH_4NO_3)، فسفر (۱۰ ppm از $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، پتاسیم (۴۰ ppm از K_2SO_4)، کلسیم (۴۰ ppm از CaCl_2)، و منیزیم (۴۰ ppm از $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- عناصر میکرو: منگنز (۵/۰ ppm)، بور (۲/۰ ppm)، مولیبدن (۰/۵ ppm)، روی (۰/۱ ppm)، و مس (۰/۱ ppm)
- آهن در شرایط نرمال: ۲ ppm از $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ همراه با اسید سیتریک به‌عنوان کلات‌کننده

pH محلول غذایی با استفاده از محلول HCl یا NaOH یک نرمال (1N) روی ۵/۵ تنظیم شد و محلول هر سه روز یکبار تعویض گردید. برای القای تنش سمیت آهن، در مرحله سه‌برگی (۱۴ روز پس از انتقال به محلول غذایی)، $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ به غلظت 300 ppm Fe^{2+} (معادل ۱/۴۹۱ گرم در لیتر) به محلول غذایی یوشیدا اضافه شد. با توجه به اکسیداسیون سریع Fe^{2+} به Fe^{3+} در شرایط هوازی، محلول حاوی آهن به‌صورت تازه تهیه و pH آن با HCl یک نرمال روی ۵/۵ تنظیم شد تا از رسوب آهن به شکل $\text{Fe}(\text{OH})_3$ جلوگیری گردد. دوره اعمال تنش ۱۴ روز بود و در پایان، امتیاز برنزه‌شدن برگ (Leaf Bronzing Score) بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد IRRI (۲۰۰۲) در مقیاس ۱-۱۰ اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

اندازه‌گیری صفات مورفوفیزیولوژیک و تعیین غلظت آهن: پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال تنش، صفات زیر اندازه‌گیری شدند: طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه، تعداد ریشه، عرض برگ و امتیاز برنزه‌شدن برگ. برای تعیین غلظت آهن در بافت ساقه، از روش هضم مرطوب با مخلوط اسید نیتریک-پرکلریک (نسبت ۴:۱ حجمی) استفاده شد. برنامه حرارتی هضم شامل مراحل زیر بود: ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، ۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه، ۱۵۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه و ۱۸۰ درجه به مدت ۶۰ دقیقه. محلول نهایی تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق و غلظت آهن با استفاده از طیف‌سنج جذب اتمی (مدل Series 2، شرکت Thermo Electron) قرائت شد.

ژنوتیپینگ: برای بررسی تنوع ژنتیکی، از ۴۰ جفت آغازگر SSR (۴۰ آلل)، ۱۶ آغازگر ISSR (مجموعاً ۷۶ آلل)، ۲ آغازگر IRAP (۷ آلل) و ۱ آغازگر iPBS (۳ آلل) استفاده شد (Chen et al. 1997; Temnykh et al. 2000; McCouch et al. 2002). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر و در شرایط استاندارد انجام شد. محصولات PCR برای نشانگرهای SSR بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد جدا و با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره قابل رؤیت شدند. اما برای بررسی الگوی باندی سایر نشانگرها از ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه از نقشه پیوندی استفاده شد. اما به‌جای استفاده از تک تک ۱۲۶ آلل به‌عنوان ویژگی مجزا، هر گروه پیوندی به‌عنوان یک ویژگی در نظر گرفته شد و با روش Position-based Dimensionality Reduction مدل سازی انجام شد.

پیش‌پردازش داده‌ها و انتخاب ویژگی: کلیه تحلیل‌های آماری و فرآیندهای مدل‌سازی در محیط MATLAB نسخه ۲۰۲۲ انجام شد. مراحل پیش‌پردازش داده‌ها شامل حذف نمونه‌هایی با بیش از ۲۰ درصد داده گمشده، تشخیص و حذف نقاط پرت بر اساس معیار فاصله بین چارکی ($\text{IQR} \times 1.5$) و استانداردسازی داده‌ها با استفاده از روش Z-score بود. پس از انجام پیش‌پردازش، برای انتخاب ویژگی، از سه الگوریتم مختلف استفاده گردید: آزمون F که در آن ویژگی‌های با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درصد انتخاب شدند؛ الگوریتم MRMR برای انتخاب ویژگی‌های مرتبط و کم‌تکرار (Peng et al. 2005) و الگوریتم RRelief برای وزن‌دهی ویژگی‌ها بر اساس توانایی آن‌ها در تمایز بین نمونه‌های همسایه مورد استفاده قرار گرفت (Kononenko 1994). هدف این بود که بهترین روش انتخاب ویژگی را مشخص کنیم. در الگوریتم RRelief، نمونه‌های همسایه به لاین‌های برنجی گفته می‌شود که از نظر مقدار صفت هدف (مثلاً امتیاز برنزه‌شدن برگ یا غلظت آهن ساقه) به یکدیگر نزدیک هستند. الگوریتم با بررسی

مکرر نمونه‌های تصادفی و همسایگان نزدیک آن‌ها در فضای هدف، وزن هر نشانگر را بر اساس توانایی آن در تشخیص این همسایگی محاسبه می‌کند؛ اگر یک نشانگر در دو نمونه همسایه (با مقادیر هدف مشابه) مقادیر متفاوتی داشته باشد، وزن آن کاهش می‌یابد؛ اما اگر دو نمونه با مقادیر هدف متفاوت، تفاوت ژنتیکی در آن نشانگر داشته باشند، وزن آن افزایش می‌یابد. در نهایت، نشانگرهایی با بالاترین وزن به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی‌ها برای پیش‌بینی تحمل به سمیت آهن انتخاب می‌شوند.

جدول ۱. امتیازدهی براساس میزان برنزه‌شدن برگ (Leaf Bronzing Score) بر اساس سیستم

ارزیابی استاندارد IRRI (2002)

Table 1. Scoring based on the degree of leaf bronzing (Leaf Bronzing Score) according to the IRRI Standard Evaluation System (2002).

توصیف Description	مساحت تحت تاثیر برگ (%) Leaf area affected (%)	امتیاز Score
برگ‌های سالم، بدون علائم بیماری Healthy leaves, no symptoms	0	0
تعداد بسیار کمی لکه‌های کوچک قهوه‌ای روی پیرترین برگ‌ها. Very few small brown specks on oldest leaves	1-10	1
لکه‌های قهوه‌ای روی پیرترین برگ‌ها گسترده‌تر و بزرگ‌تر شده‌اند؛ چند لکه قهوه‌ای نیز روی برگ‌های میانی دیده می‌شود. Brown specks on oldest leaves more spread and enlarged; few brown specks on middle leaves	11-29	3
بیش از ۵۰٪ از برگ‌های پیر با ضایعات قهوه‌ای پوشیده شده‌اند؛ لکه‌های قهوه‌ای بزرگ‌شده روی برگ‌های میانی. >50% of old leaves covered by brown lesions; enlarged brown specks on middle leaves	30-69	5
برگ‌های پیر به‌طور کامل با ضایعات قهوه‌ای پوشیده شده‌اند؛ بیش از ۵۰٪ از برگ‌های میانی نیز با ضایعات قهوه‌ای پوشیده شده‌اند. Old leaves entirely covered by brown lesions more than 50% of middle leaves covered by brown lesions	70-89	7
تمام گیاه با ضایعات قهوه‌ای پوشیده شده است؛ جوان‌ترین برگ ممکن است سبز به نظر برسد. Whole plant covered with brown lesions; youngest leaf may look green	90-99	9
تمام گیاه در حال خشکیدن یا مرده است. Whole plant dying or dead	100	10

در بخش مدل‌سازی و اعتبارسنجی، ده مدل یادگیری ماشین شامل شبکه عصبی مصنوعی (MLP)، ماشین بردار پشتیبان با کرنل (SVM-RBF)، درخت تصمیم، روش‌های گروهی شامل جنگل تصادفی، XGBoost و AdaBoost، فرایند گاوسی (GPR)، رگرسیون خطی، تحلیل ممیز خطی (LDA)، نزدیک‌ترین همسایه (KNN) و Naive Bayes پیاده‌سازی شدند. داده‌ها به نسبت ۷۰:۳۰ به مجموعه‌های آموزش و آزمون تقسیم شدند (Holdout Validation) و به منظور ارزیابی پایداری مدل‌ها و جلوگیری از بیش‌برازش، از اعتبارسنجی متقاطع K-fold با K=5 استفاده شد (James et al. 2021). همچنین در صورت نیاز، روش Stratified K-fold برای حفظ توزیع متغیر هدف به کار گرفته شد. بهینه‌سازی فرارامترها با استفاده از جستجوی شبکه‌ای (Grid Search) و بهینه‌سازی بیزی (Bayesian Optimization) انجام شد و ارزیابی نهایی مدل‌ها بر روی مجموعه آزمون (داده‌های دیده‌نشده) صورت گرفت.

معیارهای ارزیابی مدل‌ها: دقت پیش‌بینی مدل‌ها با سه معیار ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE)، میانگین خطای

مطلق (MAE) و ضریب تعیین (R^2) ارزیابی شد. در معادلات زیر، y_i مقدار واقعی مشاهده‌شده برای نمونه i ام، $\hat{y}_i$ مقدار پیش‌بینی‌شده توسط مدل برای همان نمونه، $\bar{y}$ میانگین حسابی تمام مقادیر واقعی و n تعداد کل نمونه‌ها است.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (۱)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i| \quad (۲)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (۳)$$

تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. کلیه محاسبات آماری در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

برای تفسیر صحیح نتایج، ۱۲ حالت پیش‌بینی (D1-D12) بر اساس ترکیب نوع داده‌های ورودی (فنوتیپی، ژنوتیپی یا ترکیبی) و شرایط مدل‌سازی (نرمال، تنش یا بین شرایطی) طراحی شد. همان‌گونه که در جدول ۲ ارائه شده است، این چارچوب امکان ارزیابی هم‌زمان اثر این دو عامل بر عملکرد الگوریتم‌های یادگیری ماشین را فراهم کرد. حالت‌های پیش‌بینی D1 تا D3 مبتنی بر داده‌های نرمال، D4 تا D9 شامل شرایط تنش یا بین شرایطی و D10 تا D12 متکی بر کل داده‌ها بودند.

جدول ۲. مقایسه عملکرد حالت‌های مختلف پیش‌بینی تحمل به سمیت آهن

Table 2. Performance comparison of different prediction scenarios for iron toxicity tolerance

تفسیر کلیدی Key Interpretation	میانگین خطای مطلق (آزمون) MAE (Test)	ریشه میانگین مربعات خطای (آزمون) RMSE (Test)	ضریب تعیین (آزمون) R ² (Test)	مدل انتخاب شده Selected Model	شرایط Condition	نوع داده data type	حالت Scenario
کمترین خطا اما R ² منفی Lowest error but negative R ²	0.193	0.240	-0.044	FHGP	نرمال→نرمال Normal→Normal	فنوتیپی Phenotypic	D1
پایداری نسبی Relative stability	0.197	0.232	0.049	FHGP	نرمال→نرمال Normal→Normal	ژنوتیپی Genotypic	D2
بهترین تعادل در داده‌های نرمال Best balance in normal data	0.192	0.242	0.049	FHGP	نرمال→نرمال Normal→Normal	ترکیبی Combined	D3
تنها مدل با R ² مثبت در تنش The only model with a positive R ² under stress	1.142	1.398	0.189	MHAdaB	تنش→تنش Stress→Stress	فنوتیپی Phenotypic	D4
بهترین تعادل خطا و توضیح‌دهی Best balance between error and explanatory power	0.715	0.849	0.466	FHRF	تنش→تنش Stress→Stress	ژنوتیپی Genotypic	D5
عملکرد متعادل در داده‌های ترکیبی Balanced performance on combined data	0.863	1.181	0.274	FHGP	تنش→تنش Stress→Stress	ترکیبی Combined	D6
پیش‌بینی ناموفق Unsuccessful prediction	1.155	1.520	-0.106	RHGP	تنش→نرمال Normal→Stress	فنوتیپی Phenotypic	D7
بین شرایطی قابلیت پیش‌بینی محدود Predictive capability limited across conditions	0.611	0.800	0.678	MHGP	تنش→نرمال Normal→Stress	ژنوتیپی Genotypic	D8
عملکرد متوسط Moderate performance	0.983	1.247	0.355	FHGP	تنش→نرمال Normal→Stress	ترکیبی Combined	D9
بهترین عملکرد کلی Best overall performance	0.677	0.964	0.971	FHRF	کل داده‌ها All Data	فنوتیپی Phenotypic	D10
پیش‌بینی ضعیف‌ترین حالت Weakest case prediction	5.221	5.355	-0.001	RHGP	کل داده‌ها All Data	ژنوتیپی Genotypic	D11
عملکرد عالی با ادغام داده‌ها Excellent performance with data integration	0.701	1.047	0.962	MHGP	کل داده‌ها All Data	ترکیبی Combined	D12

تحلیل عملکرد حالت‌های پیش‌بینی مبتنی بر داده‌های نرمال (D1-D3): عملکرد ضعیف حالت‌های پیش‌بینی مبتنی

بر داده‌های فنوتیپی تحت تنش (D4, D7) نشان داد که فنوتیپ‌برداری تحت تنش، بدون اطلاعات ژنتیکی، برای پیش‌بینی پایدار کافی نیست. در مقابل، D5 (ژنوتیپی تحت تنش) با استفاده از الگوریتم Random Forest به تعادل قابل قبولی دست یافت (مراجعه به مقادیر $R^2\text{-TEST} = 0.466$ و $MAE = 0.715$ در جدول ۲).

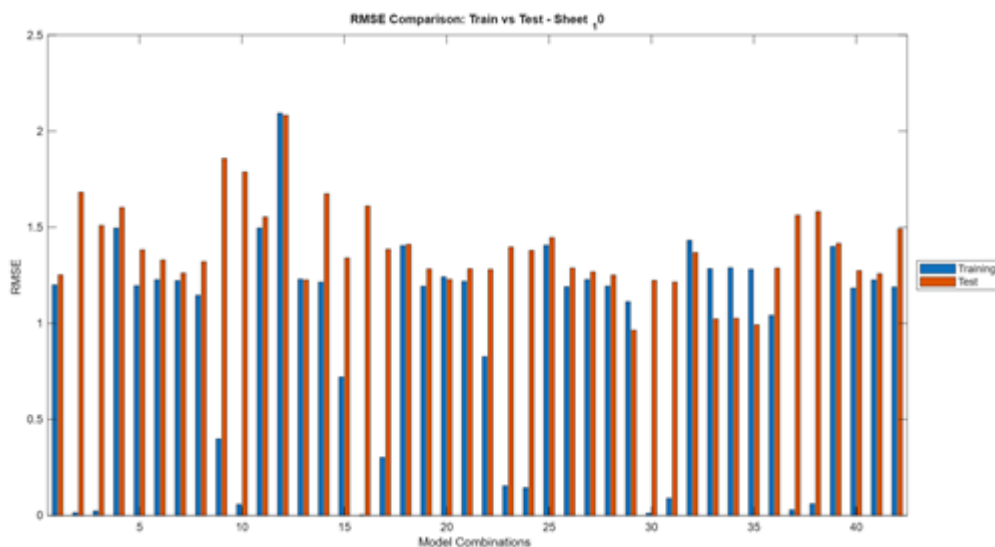
عملکرد نسبتاً بهتر D8 در مقایسه با سایر حالت‌های بین‌شرایطی نشان می‌دهد که استفاده از داده‌های ژنوتیپی همراه با انتخاب ویژگی MRMR می‌تواند بخشی از الگوهای آماری مرتبط با پاسخ به سمیت آهن را در جمعیت مورد مطالعه حفظ کند. با این حال، باید تأکید کرد که MRMR صرفاً ویژگی‌هایی را انتخاب می‌کند که از نظر آماری با متغیر هدف مرتبط بوده و در عین حال افزونگی کمتری با سایر ویژگی‌ها دارند. بنابراین، انتخاب یک نشانگر توسط MRMR به‌تنهایی به معنی نقش عملکردی آن نشانگر در مکانیسم تحمل به سمیت آهن نیست. با این حال، مقدار R^2 این حالت پیش‌بینی (۰/۶۷۸) آن را در رده‌بندی کلی در سطح متوسط قرار داد. عملکرد سایر حالت‌های پیش‌بینی این گروه (D6, D9) نیز با توجه به شاخص‌هایشان در سطح متوسط ارزیابی شد.

تحلیل عملکرد حالت‌های پیش‌بینی مبتنی بر کل داده‌ها (D10-D12): در میان این سه حالت پیش‌بینی، D10 (کل

داده‌های فنوتیپی) و D12 (ترکیب کامل داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی) با دستیابی به ضرایب تعیین بسیار بالا (به ترتیب ۰/۹۷۱ و ۰/۹۶۲) به عملکرد عالی دست یافتند (جدول ۲). زمانیکه تنها داده‌های مولکولی و مارکر مورد استفاده قرار می‌گیرد چون نشانگرهای استفاده شده نسبت به حجم و گستردگی ژنوم کم است، مقدار ضریب تعیین کم شد.

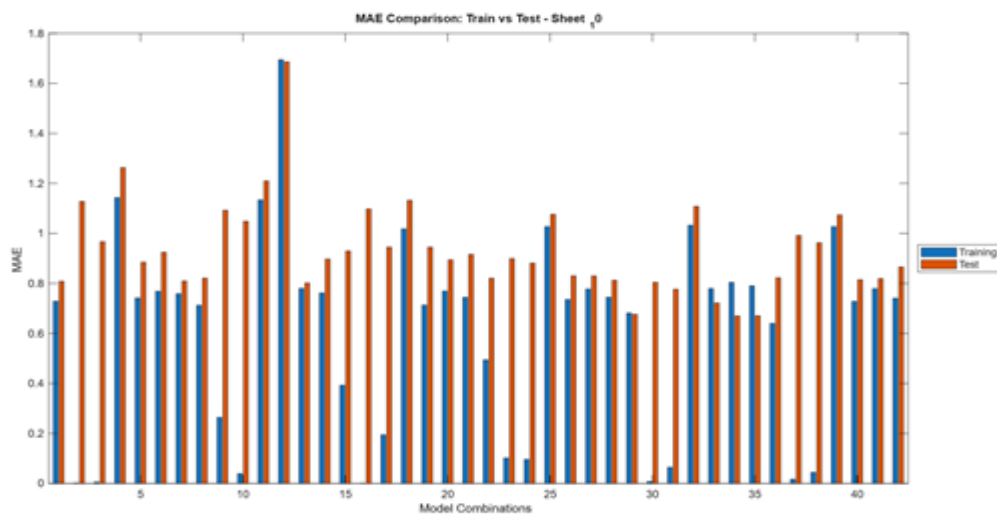
این نتایج نشان می‌دهد که در چارچوب داده‌های این آزمایش، ادغام داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی می‌تواند دقت پیش‌بینی را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد. با این حال، R^2 بسیار بالا در D10 و D12 باید با احتیاط تفسیر شود، زیرا این حالت‌ها از داده‌های کامل همان جمعیت و همان آزمایش استفاده کرده‌اند و بنابراین ممکن است بخشی از عملکرد بالای آن‌ها ناشی از ساختار مشترک داده‌ها، همبستگی میان اندازه‌گیری‌های نرمال و تنش، یا یادگیری الگوهای اختصاصی جمعیت مورد مطالعه باشد. از این رو، این مدل‌ها در این مرحله باید به‌عنوان شاخصی از عملکرد داخلی بالا در مجموعه داده موجود تلقی شوند، نه شواهد قطعی از تعمیم‌پذیری به ژنوتیپ‌های کاملاً جدید یا شرایط مزرعه‌ای مستقل.

برای درک دقیق‌تر مکانیسم این موفقیت، تحلیل‌های جامعی از خطا (شکل‌های ۱ و ۲ برای D10؛ شکل‌های ۶ و ۷ برای D12)، پایداری (شکل‌های ۴ و ۹)، بیش‌برازش (شکل‌های ۳ و ۸) و رتبه‌بندی نهایی مدل‌ها (شکل‌های ۵ و ۱۰) انجام شده است. این تحلیل‌های تکمیلی نشان می‌دهند که مدل‌های برتر در این حالت‌های پیش‌بینی نه تنها دقت پیش‌بینی بالا، بلکه پایداری قابل توجه و تعمیم‌پذیری مناسبی نیز دارند. در مقابل، D11 (کل داده‌های ژنوتیپی) با R^2 نزدیک به صفر و میانگین خطای مطلق بسیار بالا (۵/۲۲۱)، ضعیف‌ترین نتیجه را ثبت کرد (جدول ۲). این شکست، لزوم انجام پیش‌پردازش دقیق و انتخاب ویژگی هدفمند در مواجهه با چالش ابعاد بسیار بالای داده‌های ژنومی خام را آشکار می‌سازد.



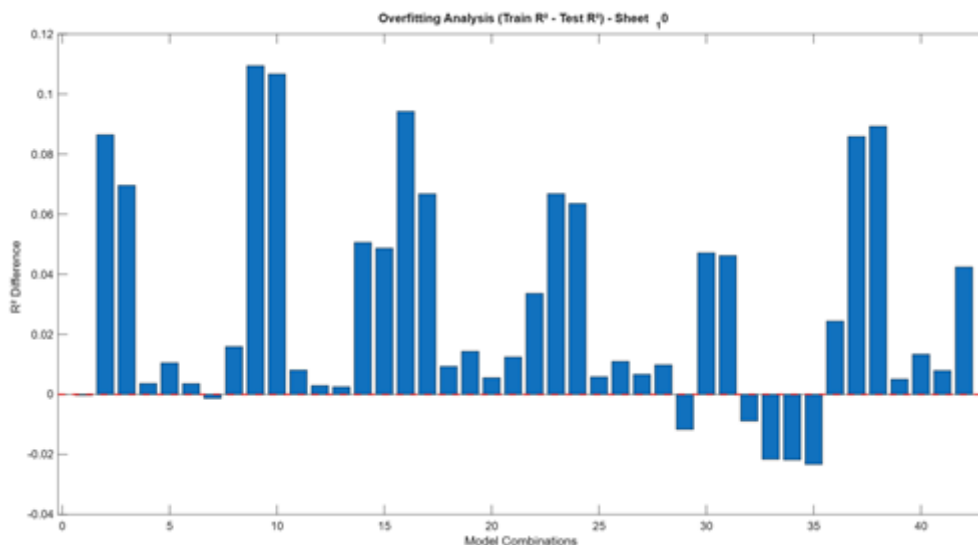
شکل ۱. مقایسه خطای پیش‌بینی مدل‌ها (Test RMSE) در مدل‌های مبتنی بر کل داده‌های فنوتیپی در شرایط نرمال ← تنش (D10)

Figure 1. Comparison of prediction error (Test RMSE) in models based on all phenotypic data under normal → stress conditions (D10)



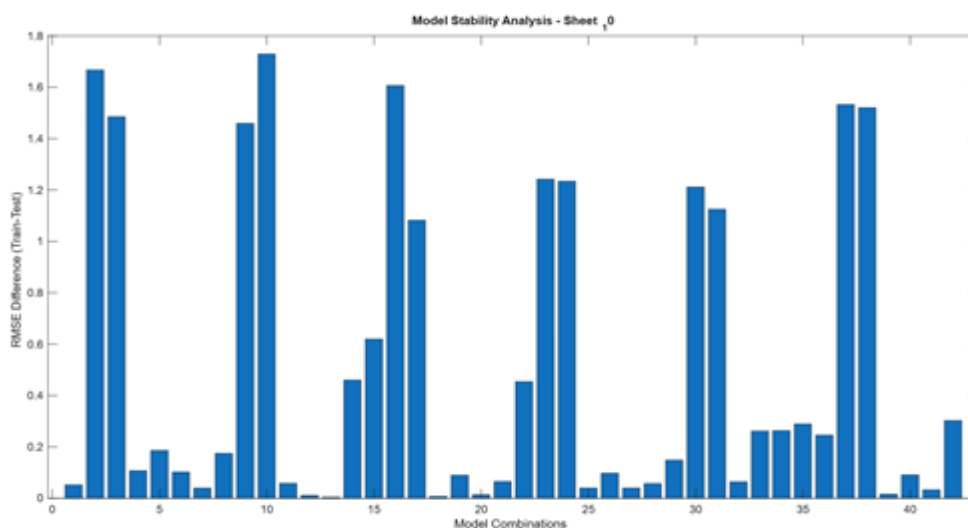
شکل ۲. مقایسه میانگین قدر مطلق خطا (Test MAE) در مدل‌های مبتنی بر کل داده‌های فنوتیپی در شرایط نرمال ← تنش (D10)

Figure 2. Comparison of mean absolute error (Test MAE) in models based on all phenotypic data under normal → stress conditions (D10)



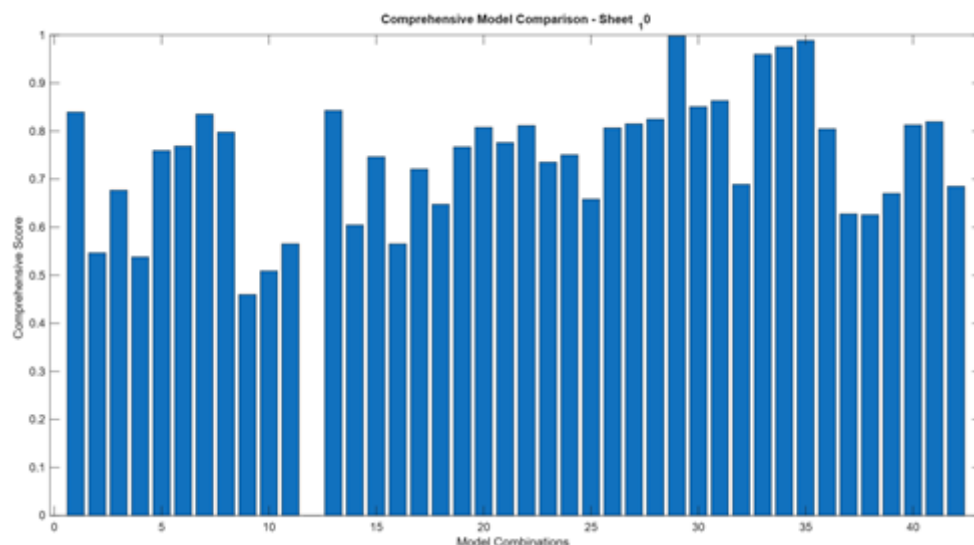
شکل ۳. تحلیل کمی بیش‌برازش از طریق اختلاف ضریب تعیین ($\text{Train } R^2 - \text{Test } R^2$) برای کل داده‌های فنوتیپی در شرایط نرمال $\leftarrow$ تنش (D10)

Figure 3. Quantitative analysis of overfitting through the difference in coefficient of determination ($\text{Train } R^2 - \text{Test } R^2$) for all phenotypic data under normal $\rightarrow$ stress conditions (D10)



شکل ۴. تحلیل پایداری مدل‌ها بر اساس اختلاف مطلق خطای RMSE بین فاز آموزش و آزمون برای کل داده‌های فنوتیپی در شرایط نرمال $\leftarrow$ تنش (D10)

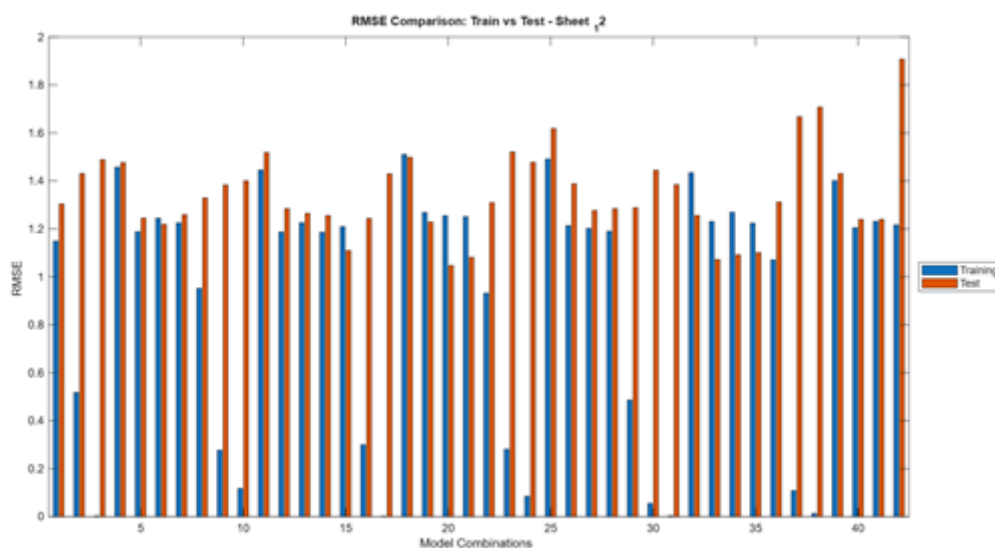
Figure 4. Stability analysis of models based on the absolute difference in RMSE between training and testing phases for all phenotypic data under normal $\rightarrow$ stress conditions (D10)



شکل ۵. رتبه‌بندی نهایی مدل‌ها بر اساس امتیاز جامع عملکرد (Comprehensive Score) برای کل

داده‌های فنوتیپی در شرایط نرمال → تنش (D10)

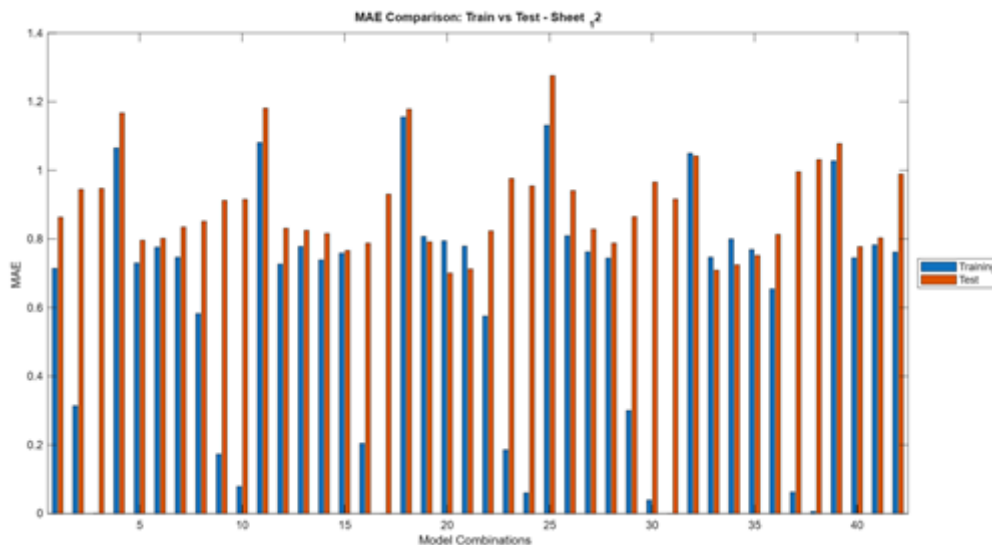
Figure 5. Final ranking of models based on comprehensive performance score for all phenotypic data under normal → stress conditions (D10)



شکل ۶. مقایسه خطای پیش‌بینی مدل‌ها (Test RMSE) بر اساس کل داده‌های ترکیبی در شرایط

نرمال → تنش (D12)

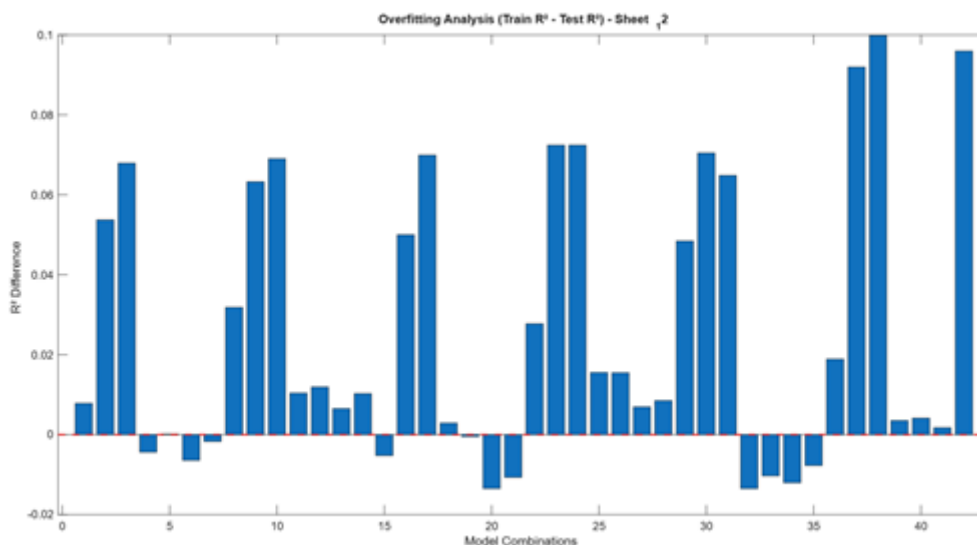
Figure 6. Comparison of prediction error (Test RMSE) in models based on all combined data under normal → stress conditions (D12)



شکل ۷. مقایسه میانگین قدر مطلق خطا (Test MAE) در مدل‌های مبتنی بر کل داده‌های ترکیبی در

شرایط نرمال ← تنش (D12)

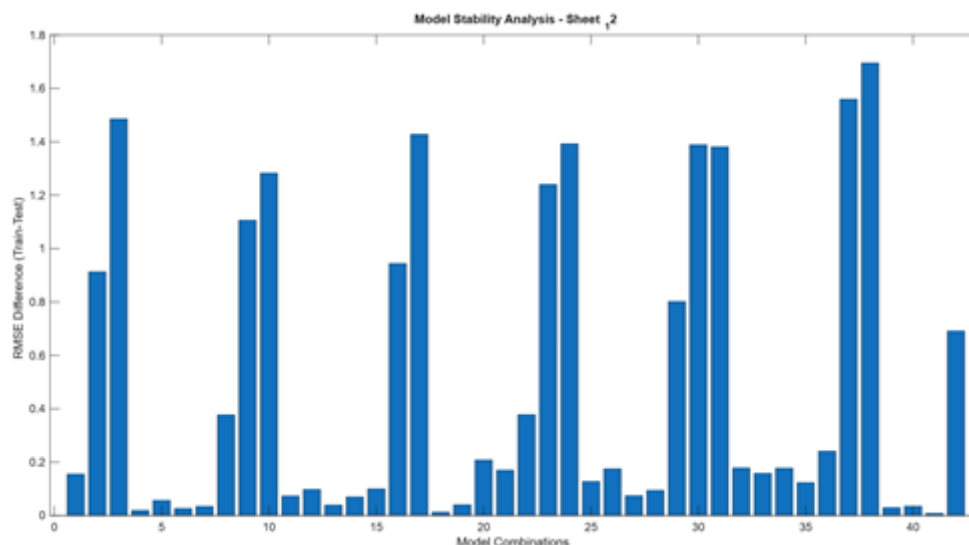
Figure 7. Comparison of mean absolute error (Test MAE) in models based on all combined data under normal → stress conditions (D12)



شکل ۸. تحلیل کمی بیش‌برازش از طریق اختلاف ضریب تعیین ($\text{Train } R^2 - \text{Test } R^2$) برای کل

داده‌های ترکیبی در شرایط نرمال ← تنش (D12)

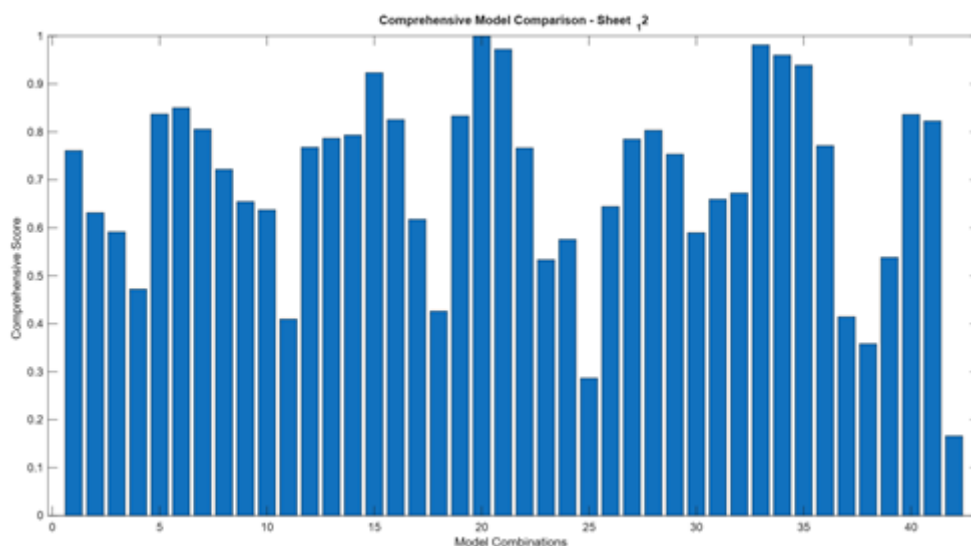
Figure 8. Quantitative analysis of overfitting through the difference in coefficient of determination ($\text{Train } R^2 - \text{Test } R^2$) for all combined data under normal → stress conditions (D12)



شکل ۹. تحلیل پایداری مدل‌ها بر اساس اختلاف مطلق خطای RMSE بین فاز آموزش و آزمون برای

کل داده‌های ترکیبی در شرایط نرمال ← تنش (D12)

Figure 9. Stability analysis of models based on the absolute difference in RMSE between training and testing phases for all combined data under normal → stress conditions (D12)



شکل ۱۰. رتبه‌بندی نهایی مدل‌ها بر اساس امتیاز جامع عملکرد (Comprehensive Score) برای

کل داده‌های ترکیبی در شرایط نرمال ← تنش (D12)

Figure 10. Final ranking of models based on comprehensive performance score for all combined data under normal → stress conditions (D12)

رتبه‌بندی نهایی بر اساس یک امتیاز ترکیبی وزن‌دار که توازن بین سه معیار کلیدی ضریب تعیین (R^2)، ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) و میانگین خطای مطلق (MAE) را در نظر می‌گیرد، انجام شد و منجر به دسته‌بندی حالت‌های پیش‌بینی در چهار سطح اصلی گردید: حالت‌های پیش‌بینی D10 و D12 در دسته عالی؛ حالت‌های پیش‌بینی D8، D5، D3، D2 و D9 در دسته متوسط؛ حالت‌های پیش‌بینی D1، D4 و D7 در دسته ضعیف؛ و حالت پیش‌بینی D11 در دسته خیلی ضعیف قرار گرفتند. این دسته‌بندی که بر مبنای تفسیر محافظه‌کارانه‌تر و دقیق‌تری از معیار R^2 انجام شده است، نشان می‌دهد حالت‌های پیش‌بینی مانند D5 و D8، با وجود برخورداری از برخی جنبه‌های کاربردی مثبت، به دلیل محدودیت در قدرت تبیین کلی، در رده عملکرد متوسط قرار می‌گیرند.

امتیاز ترکیبی نهایی با وزن‌دهی سه معیار اصلی محاسبه گردید: میانگین خطای مطلق (MAE) با وزن ۰/۴۰، ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) با وزن ۰/۳۵ و ضریب تعیین (R^2) با وزن ۰/۲۵. این وزن‌ها بر اساس اصول شناخته‌شده در ارزیابی مدل‌های پیش‌بین انتخاب شدند (Caruana & Niculescu-Mizil 2004). وزن بالاتر MAE به دلیل نقش مستقیم آن در سنجش دقت پیش‌بینی برای کاربردهای عملی، وزن متوسط RMSE برای حساسیت به خطاهای بزرگ مقیاس و وزن کمتر R^2 به دلیل وابستگی آن به مقیاس داده و محدودیت‌های تفسیری تعیین گردید (Chicco et al. 2021). این رویکرد با مطالعات مشابه در حوزه پدیداری و مدل‌سازی صفات کمی گیاهان هم‌خوانی دارد (van Dijk et al. 2021).

این پژوهش نشان داد که نوع داده و حالت پیش‌بینی مدل‌سازی تأثیر تعیین‌کننده‌ای بر دقت پیش‌بینی مقاومت به سمیت آهن در برنج دارند. عملکرد مدل‌ها را می‌توان بر اساس رتبه‌بندی و دسته‌بندی تجدید نظر شده در چهار سطح بررسی کرد. حالت‌های پیش‌بینی عالی (D10, D12): این حالت‌های پیش‌بینی با دسترسی به کل داده‌ها، به عملکردی ممتاز با $R^2 > 0.96$ و خطای بسیار پایین دست یافتند. هم‌افزایی بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و اثربخشی الگوریتم‌های انتخاب‌شده (مانند Random Forest) کلید این موفقیت بود. حالت‌های پیش‌بینی متوسط (D2, D3, D5, D6, D8, D9): این گروه که اکثریت حالت‌های پیش‌بینی را شامل می‌شوند، عملکردی دوگانه داشتند. از یک سو، برخی مانند D5 و D8 به تعادل قابل قبولی بین خطا ($MAE \approx 0.6-0.7$) و به قدرت توضیح‌دهندگی ($R^2 = 0.466-0.678$) رسیدند (جدول ۳).

از سوی دیگر، حالت‌های پیش‌بینی مانند D2 و D3 با وجود خطای مطلق بسیار پایین ($MAE \approx 0.2$)، به دلیل R^2 نزدیک به صفر (در حدود ۰/۰۵) از قدرت تعمیم‌پذیری بسیار محدودی برخوردار بودند. به‌طور خاص، حالت پیش‌بینی D8 اگرچه از منظر کاربرد عملی و هزینه‌اثربخشی جذاب است، اما با توجه به شاخص R^2 ، در این بازنگری در دسته عملکرد متوسط قرار گرفت. این امر بر اهمیت در نظر گرفتن توأم همه معیارهای ارزیابی و تفسیر محافظه‌کارانه‌تر نتایج تأکید می‌کند. حالت پیش‌بینی بسیار ضعیف (D11) (جدول ۳) بر نوع داده‌ها و کیفیت آنها تأکید دارد. نظر به پوشش ژنومی پایین نشانگرها، انتظار می‌رود با افزایش تعداد ماکرها ضریب تبیین نیز بالاتر رود.

جدول ۳. رتبه‌بندی نهایی حالت‌های پیش‌بینی بر اساس امتیاز ترکیبی وزن‌دار

Table 3. Final ranking of prediction scenarios based on weighted composite score

رتبه	حالت پیش-بینی	امتیاز ترکیبی Composite Score	ضریب تعیین (آزمون) R^2	ریشه میانگین مربعات خطای (آزمون) RMSE	میانگین خطای مطلق (آزمون) MAE	جایگاه	توضیح
Rank	Scenario		(Test)	(Test)	(Test)	Position	Explanation
1	D10	94.7	0.971	0.964	0.677	عالی Excellent	بهترین عملکرد کلی پایین‌ترین MAE و بالاترین R^2 Best overall performance: the lowest MAE and the highest R^2 عملکرد برتر با ادغام داده MAE پایین و R^2 عالی
2	D12	92.3	0.962	1.047	0.701	عالی Excellent	Superior performance with data integration: low MAE and excellent R^2 دقت پیش‌بینی و خطای قابل قبول، اما R^2 در محدوده متوسط
3	D8	85.1	0.678	0.800	0.611	متوسط Moderate	Good predictive accuracy and acceptable error, but R^2 in the moderate range پایدارترین حالت پیش‌بینی متعادل مناسب MAE و R^2
4	D5	72.8	0.466	0.849	0.715	متوسط Moderate	Most stable prediction case: an appropriate balance between MAE and R^2
5	D3	65.4	0.049	0.242	0.192	متوسط Moderate	کمترین MAE مطلق، اما R^2 بسیار محدود Lowest MAE, but very limited R^2
6	D6	60.2	0.274	1.181	0.863	متوسط Moderate	عملکرد متوسط در داده‌های پرنویز Moderate performance on noisy data
7	D2	58.9	0.049	0.232	0.197	متوسط Moderate	MAE پایین، اما R^2 ناچیز (توضیح‌دهندگی ضعیف) Low MAE, but negligible R^2 (poor explanatory power)
8	D9	55.7	0.355	1.247	0.983	متوسط Moderate	MAE بالا؛ عملکرد ضعیف در پیش‌بینی بین شرایطی High MAE; weak performance in cross-condition prediction
9	D1	52.3	-0.044	0.240	0.193	ضعیف Weak	R^2 منفی (نشانه بیش‌برازش) Negative R^2 (a sign of overfitting)
10	D4	48.6	0.189	1.398	1.142	ضعیف Weak	MAE بالا و R^2 محدود؛ عملکرد ضعیف تحت تنش High MAE and limited R^2 ; weak performance under stress
11	D7	41.2	-0.106	1.520	1.155	ضعیف Weak	شکست در پیش‌بینی (MAE بالا و R^2 منفی) Failure in prediction (high MAE and negative R^2)
12	D11	15.0	-0.001	5.355	5.221	بسیار ضعیف Weakest	ضعیف‌ترین حالت، MAE بسیار بالا Weakest case: very high MAE,

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ادغام داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین می‌تواند دقت پیش‌بینی تحمل گیاهچه‌های برنج به سمیت آهن را افزایش دهد. برتری حالت‌های پیش‌بینی D10 و D12 با دستیابی به ضرایب تعیین بالا، نشان می‌دهد که مدل‌های یادگیری ماشین در صورت دسترسی به داده‌های چندمنبعی و پردازش شده می‌توانند الگوهای پیچیده مرتبط با تحمل به تنش را استخراج کنند. این یافته با دیدگاه (Gill et al. (2022 هم‌خوانی دارد. آن‌ها بیان کردند فنوتیپ‌برداری پرتوان همراه با یادگیری ماشین و یادگیری عمیق می‌تواند فنوتیپ‌برداری در برنامه‌های اصلاحی را کاهش دهد. با این حال مطالعه حاضر به‌جای اتکا صرف به فنوتیپ‌برداری گسترده تحت تنش، امکان پیش‌بینی بین‌شرایطی از داده‌های جمع‌آوری شده در شرایط نرمال را نیز بررسی کرده است. نتایج این مطالعه نشان داد که حتی با داده‌های نسبتاً محدودتر، در صورت انتخاب ویژگی مناسب و طراحی دقیق سناریوهای پیش‌بینی، می‌توان به مدل‌هایی با کاربرد عملی در غربالگری اولیه دست یافت. از سوی دیگر، یافته‌های این پژوهش با نتایج (Danilevicz et al. (2022 نیز قابل مقایسه است. آن‌ها تأکید کردند که ابزارهای متداول پیش‌بینی ژنومی، مانند GBLUP، معمولاً در شناسایی روابط غیرخطی در داده‌های چندبعدی محدودیت دارند و الگوریتم‌های یادگیری ماشین می‌توانند به دلیل توانایی در استخراج خودکار ویژگی‌ها، برای پیش‌بینی ژنوتیپ به فنوتیپ مناسب‌تر باشند. نتایج مطالعه حاضر این موضوع را تأیید می‌کند؛ زیرا مدل‌های غیرخطی و ترکیبی، به‌ویژه در حالت‌های D10 و D12، عملکرد بسیار بهتری نسبت به حالت‌هایی داشتند که تنها به یک نوع داده یا داده‌های خام ژنوتیپی متکی بودند. عملکرد ضعیف D11، که بر اساس کل داده‌های ژنوتیپی بدون بهره‌گیری کافی از سیگنال‌های فنوتیپی بود، نشان داد که صرف داشتن داده‌های مولکولی برای پیش‌بینی دقیق کافی نیست و کیفیت داده، تراکم نشانگرها، انتخاب ویژگی و ساختار مدل نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. این مسئله با چالش‌هایی که (Danilevicz et al. (2022 درباره کمبود داده‌های باکیفیت، ابعاد بالای داده‌ها و دشواری مدل‌سازی روابط ژنوتیپ-فنوتیپ مطرح کرده‌اند، هم‌راستا است.

نتایج پژوهش حاضر با دیدگاه (Farooq et al. (2024 نیز هم‌راستا است. آن‌ها بیان کردند که هوش مصنوعی با توانایی بالا در تحلیل داده‌های بزرگ، شناسایی الگوها، استفاده از تنوع ژنتیکی موجود در ژن‌بانک‌ها و کاهش شکاف بین ژنوتیپ و فنوتیپ، می‌تواند کارایی برنامه‌های اصلاح نباتات را افزایش دهد. یافته‌های مطالعه حاضر این دیدگاه را در یک نمونه کاربردی تأیید می‌کند؛ زیرا استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین برای پیش‌بینی تحمل گیاهچه‌های برنج به سمیت آهن نشان داد که مدل‌های هوش مصنوعی می‌توانند روابط پیچیده میان داده‌های ژنوتیپی، فنوتیپی و پاسخ گیاه به تنش را استخراج کنند. به‌ویژه، عملکرد برتر حالت‌های D10 و D12 نشان داد که تلفیق داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی می‌تواند به افزایش دقت پیش‌بینی کمک کند و از این طریق، فرایند انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل را در برنامه‌های اصلاحی تسریع نماید. این نتیجه با تأکید (Farooq et al. (2024 بر نقش هوش مصنوعی در اصلاح دقیق، پیش‌بینی فنوتیپ بر اساس اطلاعات ژنتیکی و طراحی ارقام مناسب برای شرایط محیطی آینده مطابقت دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کارایی مدل‌های هوش مصنوعی وابسته به کیفیت داده، نوع داده ورودی و انتخاب ویژگی است؛ به‌طوری‌که عملکرد ضعیف D11 نشان داد استفاده از کل داده‌های ژنوتیپی خام، بدون انتخاب ویژگی مؤثر،

الزاماً منجر به پیش‌بینی دقیق نمی‌شود. بنابراین، همان‌گونه که این نویسندگان بر ضرورت استفاده هدفمند از ابزارهای هوش مصنوعی در اصلاح نباتات تأکید کرده‌اند، نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد که موفقیت مدل‌های پیش‌بینی در اصلاح برنج نیازمند طراحی دقیق داده‌های ورودی، کاهش نویز و ادغام هوشمندانه منابع اطلاعاتی مختلف است.

در ارتباط مستقیم با سمیت آهن در برنج، نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Ahmed et al. (2023) هم‌خوانی قابل توجهی دارد. آن‌ها در بررسی ۱۱ ژنوتیپ برنج تحت سطوح مختلف Fe^{2+} نشان دادند که افزایش غلظت آهن، به‌ویژه در سطوح بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، موجب کاهش جوانه‌زنی، رشد و عملکرد می‌شود و صفاتی مانند سبزی‌نگی برگ، نرخ فتوسنتز خالص، پایداری غشا و محتوای آهن در برگ و ریشه از شاخص‌های مهم تفکیک ژنوتیپ‌های متحمل و حساس هستند. در پژوهش حاضر نیز اعمال تنش سمیت آهن در مرحله گیاهچه‌ای باعث ایجاد تفاوت در صفات فنوتیپی و امتیاز برنزه‌شدن برگ شد و همین تفاوت‌ها مبنای مدل‌سازی پیش‌بینی قرار گرفتند. عملکرد D10 نشان می‌دهد که داده‌های فنوتیپی، هنگامی که از هر دو شرایط نرمال و تنش گردآوری شوند، توان بالایی در توضیح تغییرات تحمل به سمیت آهن دارند. با این حال، تفاوت مهم پژوهش حاضر در این است که مطالعه حاضر علاوه بر ارزیابی مستقیم پاسخ به تنش، به دنبال کاهش وابستگی به فنوتیپ‌برداری پرهزینه تحت تنش بوده است در حالی که در مطالعه Ahmed et al. (2023)، شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل عمدتاً بر اساس ارزیابی مستقیم فیزیولوژیک و رشدی تحت سطوح مختلف تنش انجام شد.

نتایج این پژوهش اهمیت انتخاب ویژگی را نشان داد. در مطالعه Zhao et al. (2016)، ترکیب الگوریتم‌های Random Forest و SVM برای تفکیک ارقام نخود بر اساس صفات ریشه نشان داد که استفاده از مهم‌ترین صفات انتخاب‌شده، عملکرد طبقه‌بندی را نسبت به استفاده از کل صفات یا صفات تصادفی به‌طور معنی‌داری بهبود می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز عملکرد مناسب D8 را می‌توان به نقش الگوریتم MRMR در انتخاب نشانگرهای اطلاعاتی و کاهش افزونگی داده‌ها نسبت داد. در مقابل، عملکرد بسیار ضعیف D11 نشان داد که ورود همه داده‌های ژنوتیپی خام بدون انتخاب ویژگی مؤثر، نه تنها موجب بهبود پیش‌بینی نمی‌شود، بلکه می‌تواند به دلیل نویز، افزونگی و پوشش ناکافی ژنوم، قدرت مدل را کاهش دهد. بنابراین نتایج حاضر نشان می‌دهند که در داده‌های پیچیده گیاهی، انتخاب ویژگی یک مرحله جانبی نیست، بلکه یکی از اجزای اصلی موفقیت مدل‌های یادگیری ماشین است. در مجموع، مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سه اصل کلیدی در پیش‌بینی تحمل به تنش‌های غیرزنده اهمیت دارد: نخست، استفاده از داده‌های چندمنبعی برای پوشش ابعاد مختلف پاسخ گیاه؛ دوم، به‌کارگیری الگوریتم‌های یادگیری ماشین و هوش مصنوعی برای مدل‌سازی روابط غیرخطی و پیچیده میان ژنوتیپ، فنوتیپ و پاسخ به تنش؛ و سوم، انتخاب ویژگی هدفمند برای کاهش نویز و افزایش قابلیت تفسیر مدل.

نتایج این پژوهش پیامدهای مهمی برای برنامه‌های عملی اصلاح نباتات دارد که می‌تواند در قالب یک رویکرد چندمرحله‌ای اجرا شود. با توجه به عملکرد قابل قبول و متوسط حالت پیش‌بینی D8 (جدول ۳)، می‌توان از این چارچوب به عنوان یک ابزار کمکی

در غربالگری اولیه برای کاهش حجم جامعه ژنوتیپ‌ها استفاده کرد. نقطه قوت اصلی این روش، اتکای آن به داده‌های ژنوتیپی متنوع جمع‌آوری شده در شرایط نرمال و حذف نیاز اولیه به فنوتیپ‌برداری پرهزینه تحت تنش است. این امر می‌تواند به کاهش هزینه و زمان در مراحل ابتدایی برنامه‌های اصلاحی کمک کند. با این حال، با در نظر گرفتن مقدار R^2 نه چندان بالا در این حالت پیش‌بینی، این روش به تنهایی برای گزینش نهایی و قطعی ژنوتیپ‌های برتر کافی نیست. بنابراین، کاربرد بهینه آن، حذف اولیه ژنوتیپ‌های با پتانسیل بسیار پایین و متمرکز کردن منابع بر روی زیرمجموعه‌ای امیدبخش‌تر است که در مراحل بعدی باید گزینش نهایی آنها با روش‌های دقیق‌تر و فنوتیپ‌برداری مستقیم تحت تنش تأیید گردد. این رویکرد تلفیقی، توازن بین کارایی اقتصادی و دقت علمی برقرار می‌سازد.

در مطالعه حاضر، به دلیل استفاده از نشانگرهایی مانند iPBS، IRAP، ISSR و نیز کاهش ابعاد مبتنی بر گروه‌های پیوستگی، امکان انتساب دقیق همه ویژگی‌های انتخاب‌شده به موقعیت‌های فیزیکی مشخص در ژنوم و مقایسه مستقیم آن‌ها با ژن‌هایی مانند OsIRT و OsNRAMP محدود بود. بنابراین، ویژگی‌های انتخاب‌شده در D8 باید در مرحله فعلی به عنوان نشانگرهای آماری مرتبط با پاسخ به تنش در همین جمعیت تفسیر شوند، نه به عنوان شواهد قطعی از مکانیسم زیستی تحمل. برای تأیید زیستی این یافته‌ها، مطالعات بعدی باید شامل نگاشت QTL، استفاده از نشانگرهای پرتراکم‌تر مانند SNP، بررسی هم‌مکانی نشانگرهای منتخب با ژن‌های کاندیدای هموستازی آهن، و در صورت امکان تحلیل بیان ژن تحت تنش سمیت آهن باشند.

ژنوتیپ‌های شناسایی شده در مرحله غربالگری اولیه، باید در یک فرآیند اعتبارسنجی چندلایه ارزیابی شوند. در این مرحله، از حالت‌های پیش‌بینی D10 و D12 که بالاترین دقت پیش‌بینی برخوردارند برای ارزیابی دقیق‌تر و رتبه‌بندی نهایی این ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود. انتخاب نهایی تنها پس از تأیید نتایج این ارزیابی دقیق در آزمایش‌های مزرعه‌ای تحت شرایط واقعی تنش صورت می‌پذیرد. این رویکرد دو مرحله‌ای، توازن بهینه بین کارایی و دقت برقرار می‌کند. در مرحله اول، استفاده از یک روش سریع و مقرون‌به‌صرفه با دقت متوسط (مانند D8)، حجم جامعه ژنوتیپی را به مجموعه‌ای کوچک‌تر و امیدبخش‌تر کاهش می‌دهد و منابع را متمرکز می‌سازد. در مرحله نهایی، به کارگیری روش‌های با حداکثر دقت (D10، D12) و سپس آزمون میدانی، صحت و قابلیت اتکای انتخاب‌های نهایی را تأیید می‌کند. این استراتژی گام‌به‌گام، به طور کامل با فلسفه انتخاب به کمک ژنوم (GS) برای تسریع چرخه‌های اصلاحی و در عین حال حفظ دقت گزینش هم‌خوانی دارد.

این مطالعه محدودیت‌هایی دارد که مسیر تحقیقات آتی را هموار می‌سازد. حالت‌های پیش‌بینی برتر، به ویژه D10 و D12، و همچنین مدل غربالگری اولیه D8، نیازمند اعتبارسنجی خارجی روی جمعیت‌های مستقل، زمینه‌های ژنتیکی متفاوت و شرایط واقعی مزرعه هستند. از آنجا که داده‌های این مطالعه از یک جمعیت محدود به دست آمده‌اند، نمی‌توان عملکرد مشاهده شده را بدون آزمون مستقل به سایر جمعیت‌ها تعمیم داد. علاوه بر این، در مدل‌های مبتنی بر داده‌های ترکیبی، احتمال نشت داده میان رکوردهای مربوط به یک ژنوتیپ در شرایط نرمال و تنش باید به طور جدی کنترل شود. بنابراین، مطالعات آینده باید از طرح‌های اعتبارسنجی سخت‌گیرانه‌تر، مانند جداسازی کامل ژنوتیپ‌ها بین آموزش و آزمون، اعتبارسنجی برون جمعیتی، و آزمون‌های چندمحیطی استفاده

کنند. همچنین برای افزایش تفسیرپذیری زیستی، نشانگرهای انتخاب‌شده توسط MRMR باید با QTL‌های تحمل به سمیت آهن، ژن‌های کاندیدای هموستازی آهن و داده‌های بیان ژن مقایسه شوند.

از سوی دیگر، عملکرد ضعیف D11 نشان‌دهنده ضرورت به‌کارگیری روش‌های پیشرفته‌تر پیش‌پردازش و انتخاب ویژگی برای داده‌های ابعاد بالا است. همچنین برای درک بهتر پایه ژنتیکی پیش‌بینی در مدل‌هایی با دقت متوسط مانند D8، نشانگرهای انتخاب‌شده توسط الگوریتم MRMR باید با استفاده از QTL و تحلیل مسیرهای ژنی مطالعه شوند تا مبنای ژنتیکی پیش‌بینی‌ها مشخص شود. افزودن لایه‌های داده‌ای مکمل از حوزه‌های چندآمیکی، مانند رونوشت‌برداری می‌تواند دقت مدل را افزایش داده و بینش علمی درباره مکانیسم‌های تحمل به تنش ارائه کند. در نهایت، برای تطبیق با تغییرات اقلیمی، طراحی چارچوب‌های مدل‌سازی پویا که قابلیت به‌روزرسانی با داده‌های جدید را داشته باشند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه به‌وضوح نشان داد که انتخاب چارچوب مدل‌سازی و نوع داده‌های ورودی، عوامل تعیین‌کننده‌ای

در دقت پیش‌بینی صفات پیچیده مانند تحمل به سمیت آهن هستند. بر اساس یک ارزیابی سیستماتیک و محافظه‌کارانه، حالت‌های پیش‌بینی D10 و D12 که از ادغام کامل داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بهره می‌برند، در چارچوب داده‌های این آزمایش بالاترین دقت را نشان دادند. با این حال، قابلیت اعتماد این مدل‌ها برای کاربرد در برنامه‌های اصلاحی واقعی منوط به اعتبارسنجی خارجی، کنترل دقیق نشت داده و آزمون روی ژنوتیپ‌ها و محیط‌های مستقل است. موفقیت این حالت‌های پیش‌بینی، قدرت بی‌بدیل هم‌افزایی داده‌ها و مدل‌سازی یکپارچه را تأیید می‌کند. در طرف مقابل، عملکرد ضعیف یا بسیار ضعیف حالت‌های پیش‌بینی مبتنی بر داده‌های تک‌لایه (به‌ویژه D11 با داده‌های ژنومی خام) یا داده‌های کم‌حجم، محدودیت‌های ذاتی این رویکردها را آشکار ساخت. در این میان، حالت پیش‌بینی D8 با عملکردی متوسط اما کاربردی، جایگاه خاصی دارد. این حالت پیش‌بینی نشان داد که می‌توان با استفاده از داده‌های ژنوتیپی جمع‌آوری‌شده در شرایط نرمال و انتخاب ویژگی هدفمند، یک پیش‌بینی اولیه و کم‌هزینه برای غربالگری مقدماتی ارائه کرد. با این حال، با توجه به مقدار متوسط R^2 ، این مدل تنها برای کاهش اولیه اندازه جمعیت و اولویت‌بندی ژنوتیپ‌ها مناسب است و نباید جایگزین فنوتیپ‌برداری مستقیم تحت تنش یا اعتبارسنجی نهایی شود. پیام کلیدی و راهبرد عملی این پژوهش، توصیه به یک رویکرد دو مرحله‌ای تلفیقی در برنامه‌های اصلاحی است: استفاده از مدل‌های سریع و مقرون‌به‌صرفه (مانند D8) برای غربالگری اولیه و متمرکز کردن منابع و سپس اعتبارسنجی نهایی کاندیداهای برتر با دقیق‌ترین حالت‌های پیش‌بینی (D10/D12) و آزمون‌های میدانی. این استراتژی، توازن بهینه‌ای بین کارایی عملی و دقت علمی برقرار کرده و به‌طور کامل با اهداف انتخاب به کمک ژنوم (GS) برای تسریع چرخه‌های اصلاحی بدون چشم‌پوشی از اعتبار نتایج هم‌خوانی دارد. بنابراین، موفقیت در پیش‌بینی صفات پیچیده، نه در اتکا به یک ابزار واحد که در طراحی هوشمندانه یک خط‌مشی مدل‌سازی مرحله‌ای بر اساس مزایا و محدودیت‌های هر چارچوب نهفته است. نهایتاً اگرچه چارچوب ارائه‌شده گامی عملی به‌سمت تسریع چرخه‌های اصلاحی است، اما آینده تحقیقات در این زمینه نیازمند اعتبارسنجی گسترده‌تر روی جمعیت‌های مستقل و در شرایط مزرعه، و نیز درک عمیق‌تر

مکانیسم‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی تحمل به تنش از طریق تحلیل عملکردی نشانگرهای انتخاب‌شده و مطالعات QTL و ترانسکریپتومیک خواهد بود.

References

- Ahmed, S. F., Ullah, H., Aung, M. Z., Tisarum, R., Cha-Um, S., & Datta, A. (2023). Iron toxicity tolerance of rice genotypes in relation to growth, yield and physiochemical characters. *Rice Science*, 30(4), 321-334. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2023.02.002>
- Becker, M., Asch, F., & Wopereis, M. (2005). Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558–573. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520504>
- Caruana, R., & Niculescu-Mizil, A. (2004). Ensemble selection from libraries of models. In *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning (ICML)* (pp. 18–25). Banff, Canada. <https://doi.org/10.1145/1015330.1015432>
- Chen, X., McCouch, S. R., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., Huang, N., Ishii, T., & Blair, M. (1997). Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, 35, 89–99. <https://doi.org/10.1023/A:1005711431474>
- Chicco, D., & Jurman, G. (2020). The advantages of the Matthews correlation coefficient (MCC) over F1 score and accuracy in binary classification evaluation. *BMC Genomics*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6413-7>
- Danilevicz, M. F., Gill, M., Anderson, R., Batley, J., Bennamoun, M., Bayer, P. E., & Edwards, D. (2022). Plant genotype to phenotype prediction using machine learning. *Frontiers in Genetics*, 13, 822173. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.822173>
- Dos Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F., & Domingues, D. S. (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. *Stresses*, 2(1), 113-135. <https://doi.org/10.3390/stresses2010009>
- Farooq, M. A., Gao, S., Hassan, M. A., Huang, Z., Rasheed, A., Hearne, S., ... & Li, H. (2024). Artificial intelligence in plant breeding. *Trends in Genetics*, 40(10), 891-908. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2024.07.001>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2021). Rice and global food security. Rome: FAO.
- Gill, T., Gill, S. K., Saini, D. K., Chopra, Y., de Koff, J. P., & Sandhu, K. S. (2022). A comprehensive review of high throughput phenotyping and machine learning for plant stress phenotyping. *Phenomics*, 2(3), 156-183. <https://doi.org/10.1007/s43657-022-00048-z>
- International Rice Research Institute (IRRI). (2002). *Standard evaluation system for rice (SES)* (5th ed.). Los Baños, Philippines: IRRI.
- James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2021). *An introduction to statistical learning* (2nd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1418-1>
- Kononenko, I. (1994). Estimating attributes: Analysis and extensions of RELIEF. In *European Conference on Machine Learning (ECML 94)* (pp. 171–182). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-57868-4_57
- Mahender, A., Swamy, B. M., Anandan, A., & Ali, J. (2019). Tolerance of iron-deficient and toxic soil conditions in rice. *Plants*, 8(2), 31. <https://doi.org/10.3390/plants8020031>

- Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B. Y., Maghirang, R., Li, Z. K., Xing, Y. Z., et al. (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9(6), 199–207. <https://doi.org/10.1093/dnares/9.6.199>
- Montesinos López, O. A., Montesinos López, A., & Crossa, J. (2022). *Multivariate statistical machine learning methods for genomic prediction*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-89010-0>
- Peng, H., Long, F., & Ding, C. (2005). Feature selection based on mutual information criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 27(8), 1226–1238. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2005.159>
- Rajonandraina, T., Rakotoson, T., Wissuwa, M., Ueda, Y., Razafimbelo, T., Andriamananjara, A., & Kirk, G. J. (2023). Mechanisms of genotypic differences in tolerance of iron toxicity in field-grown rice. *Field Crops Research*, 298, 108953. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2023.108953>
- Stein, R. J., Duarte, G. L., Scheunemann, L., Spohr, M. G., Araújo Júnior, A. T., Ricachenevsky, F. K., & Fett, J. P. (2019). Genotype variation in rice tolerance to Fe toxicity might be linked to root cell wall lignification. *Frontiers in Plant Science*, 10, 746. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00746>
- Temnykh, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., ... & McCouch, S. R. (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(5), 697–712. <https://doi.org/10.1007/s001220051342>
- van Dijk, A. D. J., Kootstra, G., Kruijer, W., & de Ridder, D. (2021). Machine learning in plant science and plant breeding. *Iscience*, 24(1). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101890>
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H., & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice* (3rd ed.). International Rice Research Institute.
- Zhao, J., Bodner, G., & Rewald, B. (2016). Phenotyping: using machine learning for improved pairwise genotype classification based on root traits. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1864. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01864>