

A genome sequencing approach to identify candidate genes for drought tolerance in rice, using a drought-tolerant mutant

Banafsheh Fattah¹, Abdolreza Bagheri^{2*} , Ali Akbar Ebadi³, Alireza Seifi⁴

1. PhD Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Associate Professor, Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

4. Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Correspondence:

Abdolreza Bagheri

Email: bagheriyazd@gmail.com

Received: 28, Dec. 2024

Accepted: 16, Sep. 2025

How to cite:

Fattah, B., Bagheri, A., Ebadi, A.A., & Seifi, A. (2025). A genome sequencing approach to identify candidate genes for drought tolerance in rice, using a drought-tolerant mutant. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 63-78. (DOI: [10.30473/cb.2025.73217.1996](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73217.1996))

ABSTRACT

Rice is a globally important food crop, and drought is a major constraint on its production, highlighting the need for drought-tolerant varieties. Next-generation sequencing (NGS) enables the identification of DNA variations, even within closely related rice lines, offering a powerful approach to unravel the genetic basis of traits like drought tolerance. Identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions (InDels) is a crucial application of NGS. This study aimed to identify candidate genes for drought tolerance by re-sequencing the genome of a drought-tolerant rice mutant and comparing it to its drought-sensitive parent, Hashemi. We identified 73,077 polymorphisms (SNPs and InDels) between the two lines. We then analyzed the segregation of large-effect variants in a segregating F2 population derived from a cross between the two lines, comparing drought-sensitive and drought-tolerant progeny. The identified SNPs were validated against previously reported SNPs, and their functional relevance was assessed based on their location within known quantitative trait loci (QTLs) and conserved protein domains. This research pinpoints a potentially valuable target gene for enhancing drought tolerance in rice breeding programs. It is hoped that by inducing targeted mutations or using genome editing techniques to produce this protein in drought-sensitive rice varieties, cultivars can be developed that, in addition to having the desired traits, will also be tolerant to drought stress.

KEY WORDS

Drought tolerance, InDels (insertions/deletions), Rice (*Oryza sativa*), SNPs (single-nucleotide polymorphisms)



«مقاله پژوهشی»

توالی‌یابی و آنالیز ژنوم رقم جهش یافته متحمل به تنش خشکی جهت شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در برنج

بنفشه فتاح^۱، عبدالرضا باقری^{۲*}، علی‌اکبر عبادی^۳، علیرضا سیفی^۴

چکیده

برنج یکی از محبوب‌ترین محصولات غذایی جهان است و تنش خشکی به عنوان مهم‌ترین چالش تولید آن، ضرورت توسعه ارقام متحمل به تنش خشکی را ایجاد می‌کند. تکنیک‌های توالی‌یابی نسل جدید از طریق شناسایی پلی‌مورفیسم در DNA، حتی در ارقام بسیار نزدیک، فرصت‌هایی را برای درک اساس ژنتیکی تفاوت‌های فنوتیپی مانند پاسخ به تنش‌های غیرزیستی فراهم می‌کنند. شناسایی SNPها و InDelها یکی از مهم‌ترین کاربردهای توالی‌یابی نسل جدید است. این تحقیق با هدف شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در لاین موتانت برنج متحمل به تنش خشکی با توالی‌یابی مجدد ژنوم برای این لاین و رقم مادری آن (هاشمی، که به خشکی حساس است)، انجام شد. در ژنوم این دو رقم تعداد ۷۳،۰۷۷ پلی‌مورفیسم شامل پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) و InDels شناسایی شد. تفرق واریانت‌های بزرگ اثر در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی این دو رقم در لاین‌های حساس و متحمل به خشکی، بررسی شد. SNPهای شناسایی شده با مواردی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند اعتبار سنجی شدند. علاوه بر این، ارتباط عملکردی SNPها بر اساس حضور آنها در مناطق QTL و دومین‌های عملکردی حفاظت شده تجزیه و تحلیل شدند. این مطالعه یک ژن هدف امیدوارکننده برای تحمل به تنش خشکی معرفی می‌کند که می‌تواند منبع ارزشمندی در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی برای تحمل به تنش خشکی برنج باشد.

واژه‌های کلیدی

تحمل به خشکی، SNP (پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی)، InDel (درج/حذف)

۱. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

نویسنده مسئول:

عبدالرضا باقری

رایانامه: bagheriyazd@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۵

استناد به این مقاله:

فتاح، بنفشه؛ باقری، عبدالرضا؛ عبادی، علی‌اکبر و سیفی، علیرضا (۱۴۰۴). توالی‌یابی و آنالیز ژنوم رقم جهش یافته متحمل به تنش خشکی جهت شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در برنج، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۶۳-۷۸.

(DOI: [10.30473/cb.2025.73217.1996](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73217.1996))

کارآمدتر از آب آبیاری، یکی از مهم‌ترین راهکارهای مقابله با بحران کمبود آب محسوب می‌شود. بنابراین شناسایی ژنوتیپ‌هایی که دارای کارایی مصرف آب بالاتری باشند، جهت بهره‌برداری در برنامه‌های آبی تولید ارقام متحمل برنج، بسیار مهم است و مطالعات عمیق در ژن‌های مرتبط با صفات مقاومت به تنش‌ها در برنج دارای اهمیت زیادی است (Woldegiorgis *et al.*, 2019).

پیدایش فناوری نسل جدید توالی‌یابی (NGS)، ابزارهای لازم برای شناسایی شبکه‌های ژنی و ژن‌های کلیدی پاسخگو برای تنش خشکی را فراهم می‌کند. درک بهتر اساس ژنتیکی صفات ثانویه متحمل به خشکی و آنالیز تغییرات آلی در مکان ژنی مربوطه کمک شایانی به به‌نژادگران خواهد نمود. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به خشکی در لاین موتانت برنج متحمل به تنش خشکی انجام شده است.

پیشینه پژوهش

توالی‌یابی ژنوم افق‌های جدیدی را پیش روی محققان قرار داده است. توالی‌یابی چند صد گونه به طور کامل، از جمله گیاهان مدل مهمی مانند برنج، تمرکز بسیاری از مطالعات علمی را به سمت آنالیزهای توالی‌یابی مجدد به منظور شناسایی و فهرست کردن تنوع ژنتیکی در افراد مختلف یک جمعیت تغییر داده است (Pagani *et al.*, 2012). از تنوع شناسایی شده در افراد با فنوتیپ متفاوت می‌توان برای تشخیص رابطه بین فنوتیپ و ژنوتیپ استفاده کرد. شناسایی تعداد زیادی از چندریختی‌های توالی مانند پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و حذف و درج‌ها (Indels)، یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری NGS است (Huang *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2009). این چندریختی‌های ژنتیکی در میان توده‌های مختلف، تعیین‌کننده اصلی تفاوت‌های فنوتیپی هستند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به دلیل بالاتر بودن فراوانی در تعیین ساختار جمعیت و تجزیه و

مقدمه

برنج علاوه بر این که یکی از مهمترین محصولات غذایی جهان است، به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات مولکولی و ژنتیکی تک لپه‌ای‌ها شناخته شده است. چیزی که برنج را به یک سیستم بیولوژیکی جذاب تبدیل کرده است داشتن کوچک‌ترین اندازه ژنوم در بین غلات، در دسترس بودن نقشه ژنتیکی اشباع، سهولت در ترانسفورماسیون و وجود اطلاعات مولکولی و ژنتیکی گسترده آن است. توالی ژنوم برنج به طور کامل در دسترس است و تلاش‌های مستمری در جهت به‌روز کردن توالی‌ها و تفسیر داده‌ها بر مبنای پروژه‌های توالی‌یابی برنج و آنالیزهای مقایسه‌ای ژنوم برنج با گیاهان دیگر انجام شده است. علاوه بر این به دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از تنوع مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در برنج و اجداد وحشی آن، به عنوان یک سیستم مدل عالی برای مطالعه تکامل در گیاهان به شمار می‌رود. در عین برخورداری از مزایا ذکر شده، میزان تولید جهانی آن در شرایط کنونی رو به افزایش نیست و این مقدار بسیار پایین‌تر از تقاضای تعیین شده در سال ۲۰۵۰ است (Ray *et al.*, 2013). صرف نظر از تعدادی عوامل زیستی و غیر زیستی که بطور منفی بر روی تولید برنج تأثیر می‌گذارند، آب یک محدودیت اصلی به خاطر کاهش سطح آب زیر زمینی و بارندگی غیر کافی در سطح جهانی است (Wada *et al.*, 2010). از این رو، شناسایی پتانسیل تحمل کمبود آب در ژنوتیپ‌های برنج از نخستین اقدامات لازم برای مقابله با اثرات سوء کمبود آب در زراعت برنج می‌باشد. شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل برای تولید ارقام زراعی متحمل به کمبود آب و دارای عملکرد بالا برای کشت در مناطق مواجه با تنش، خسارت کمبود آب را به حداقل رسانده و پایداری تولید برنج را تضمین خواهد کرد. همچنین شناسایی سازوکار تحمل تنش کمبود آب، امکان بهره‌برداری از صفات مرتبط با آن را در برنامه تولید ارقام متحمل تسهیل خواهد نمود. با توجه به محدودیت آب آبیاری برای اغلب گیاهان زراعی از جمله برنج، استفاده هر چه مفیدتر و

۱ Single Nucleotide Polymorphism

۲ Insertion-Deletion

محبوب با کیفیت دانه مطلوب بوده و دارای بیشترین سطح زیر کشت در بین ارقام محلی در استان‌های برنج‌خیز شمال کشور است. بذر لاین موتانت و مادری از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. رقم هستی به عنوان یک لاین موتانت پیشرفته متحمل به تنش خشکی از طریق پرتوتابی ۳۰۰ گری پرتو گاما بر روی بذور برنج رقم بومی هاشمی و گزینش طی نسل‌های بعدی ایجاد شده است (Ebadi & Hallajian, 2024).

استخراج DNA و توالی‌یابی

DNA ژنومی دو رقم هاشمی و هستی از گیاهچه‌های ۱۵ روزه حاصل از تک بذر به روش CTAB تغییر یافته استخراج شد (Jain et al., 2013b). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین و تأیید شد و پس از آن برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی‌یابی کل ژنوم به صورت دوسویه^۱ به روش ایلومینا (TruSeq (Illumina Platform) و با عمق خوانش 100X انجام شد. فایل داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم شامل دو فایل خوانش رفت^۲ و برگشت^۳ برای هر ژنوم با قالب fastq دریافت شد.

آنالیز داده‌های توالی‌یابی ژنوم

کنترل کیفیت داده‌های توالی‌یابی توسط برنامه FastQC تحت محیط لینوکس انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic خوانش‌های دارای کیفیت پایین و همچنین خوانش‌های دارای توالی آداپتورها یا پرایمرها حذف شدند. برای هم‌ردیفی (Alignment) خوانش‌های فیلتر شده با ژنوم مرجع *Oryza sativa Japonica* نسخه IRGSP-1.0، از الگوریتم MEM در برنامه BWA^۴ استفاده شد (Jain et al., 2013a).

تحلیل‌های عدم تعادل لینکاژی دارای اهمیت قابل توجهی هستند و InDelها نیز در انتخاب به کمک نشانگر و نقشه برداری دقیق با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hayashi et al., 2006; Liang et al., 2011). اولین شناسایی SNPها روی پیش نویس ژنوم ارقام japonica و indica انجام شده است (Feltus et al., 2004). همچنین حدود ۱۶۰۰۰۰ SNP از طریق توالی‌یابی یک ناحیه ۱۰۰ Mb از ۲۰ رقم برنج در پروژه OryzaSNP شناسایی شد (McNally et al., 2009). توالی‌یابی مجدد ۶ لاین اینبرد برنج هندی موجب شناسایی حدود ۳ میلیون پلی‌مورفیسم در DNA شده است (Subbaiyan et al., 2012). شناسایی SNPها و InDelها در ارقام برنج ژاپنی توسط محققان دیگری نیز گزارش شده است (Arai-Kichise et al., 2011; Yamamoto et al., 2010). جین و همکاران با توالی‌یابی مجدد کل ژنوم سه رقم برنج با پاسخ‌های متفاوت به خشکی و شوری، با شناسایی ۵۴۸ SNP واقع در دومین‌های عملکردی حفاظت شده ۲۳۲ ژن، نشانگرهای عملکردی و ژن‌های کاندیدی برای تحمل به شوری و خشکی ارائه کرده‌اند (Jain et al., 2013a). اگر چه حجم بالایی از اطلاعات درباره پلی‌مورفیسم DNA در برنج در دسترس است، ولی توالی‌یابی مجدد ارقام بیشتری از برنج با ویژگی‌های زراعی مهم در شناسایی پلی‌مورفیسم هدف برای نقشه‌برداری ژن‌ها و آنالیز QTLها بخصوص برای صفات پیچیده‌ای مانند مقاومت به تنش خشکی می‌تواند راهگشا باشد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

مواد گیاهی این آزمایش شامل رقم هستی یک لاین برنج (*Oryza sativa*) جهش یافته پیشرفته (M8) متحمل به تنش خشکی و رقم بومی هاشمی حساس به تنش خشکی بوده است. همچنین ۱۲۰ ژنوتیپ از جمعیت در حال تفرق F₂ حاصل از تلاقی لاین هاشمی به عنوان پایه مادری و لاین موتانت به عنوان پایه پدری مورد مطالعه قرار گرفتند. برنج هاشمی از ارقام محلی معطر و

^۱ Paired-End

^۲ Forward read

^۳ Reverse read

^۴ Burrows-Wheeler Aligner

دیتابیس <http://qtaro.abr.affrc.go.jp/> دانلود شد و بر اساس موقعیت کروموزومی آن‌ها واریانت‌های واقع شده در محدوده QTLها مورد بررسی قرار گرفتند. انوتیشن ژن‌هایی که در آن‌ها پلی‌مورفیسم رخ داده است در دیتابیس Ensembl و دیتابیس rapdb مورد بررسی قرار گرفت و به سایر داده‌های واریانت‌ها اضافه شد و در انتخاب ژن‌های کاندید لحاظ شد.

تأیید ژن‌های کاندید در جمعیت F_2

آزمایش مزرعه‌ای با هدف شناسایی تعدادی گیاه حساس و تعدادی گیاه مقاوم در جمعیت F_2 جهت تأیید ژن‌های کاندید، به طور خلاصه در چهار سال زراعی متوالی به ترتیب به صورت تلاقی دو رقم هستی و هاشمی، کاشت F_1 ، آزمایش گلدانی ژنوتیپ‌های نسل F_2 و آزمایش مزرعه‌ای فامیل‌های نسل F_3 اجرا شد.

در این تحقیق برای به دست آوردن جمعیت در حال تفرق نسل F_2 ، لاین حساس به تنش خشکی (هاشمی) به عنوان والد مادری و رقم هستی (لاین موتانت و مقاوم به تنش خشکی) به عنوان والد پدری مورد تلاقی قرار گرفتند. در سال دوم آزمایش بذره‌های حاصل از تلاقی به عنوان نسل F_1 در کنار والدین در مزرعه کشت شدند.

ژنوتیپ‌های گیاهی مورد آزمون در سال سوم در شرایط گلدانی شامل رقم هستی و هاشمی (لاین موتانت و مادری) و افراد جمعیت F_2 حاصل از تلاقی این دو رقم بودند. در سال چهارم آزمایش جهت تأیید و گزینش مجدد افراد نسل F_2 ، تعداد ۳۰ ژنوتیپ حساس و ۳۰ ژنوتیپ متحمل شناسایی شده در آزمایش گلدانی، در کنار ارقام والدی در شرایط مزرعه‌ای مورد آزمون قرار گرفتند. ارزیابی فنوتیپی بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد برنج IIRI انجام شد (IIRI, 2014).

با مشخص شدن SNP و InDel‌های تأثیرگذار در ژنوم رقم موتانت، ژن‌های کاندید شناسایی شدند. برای پلی‌مورفیسم‌های پیدا شده در گروهی از جمعیت F_2 شامل ۸ گیاه حساس و ۸ گیاه متحمل به تنش خشکی حاصل از بررسی‌های انجام شده در نتاج F_3 ، ژنوتایپینگ انجام شد تا نواحی ژنومی کاندید که با تحمل به خشکی

کاهش خطاهای حاصل از مرحله هم‌ردیفی، یک مرحله هم‌ردیفی مجدد (Realignment) با استفاده از نرم‌افزار GTAK انجام شد. به منظور تصحیح خطاهای توالی‌یابی و دیگر خطاهای مربوط به آزمایش، با استفاده از نرم‌افزار GATK نمره کیفیت بازها مجدداً کالیبره (recalibration) شد. کیفیت نقشه‌یابی با دو پارامتر درصد هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع و عمق پوشش از دستوره‌های flagstat و depth در نرم‌افزار Samtools محاسبه شد.

شناسایی و آنالیز SNPها و InDelها

واریانت‌ها شامل چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌های کوچک ژنوم با استفاده از برنامه FreeBayes به دست آمد. خروجی این برنامه یک فایل VCF حاوی SNPs و InDels برای هر نمونه است. به منظور فیلتر کردن چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌های کوچک، از ابزار VcfFilter در برنامه vcftools استفاده شد.

برای شناسایی واریانت‌های منحصر به نمونه موتانت (موجود در موتانت و غایب در نمونه هاشمی) از ابزار vcf-isec در برنامه vcftools استفاده شد. به منظور تفسیر، محاسبه شمارش هموزیگوس‌ها و هتروزیگوس‌ها در چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و درج‌ها، همچنین شمارش جهش‌های جابجایی و معکوس در چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی، از برنامه snpEff استفاده شد (Cingolani *et al.*, 2012). برای اعتبار سنجی SNPها از گزارش‌های حاصل از مطالعات گذشته استفاده شد. برای این کار داده‌های SNP مربوط به *Oryza sativa* موجود در دیتابیس Ensembl دانلود و مورد استفاده قرار گرفت.

یکی از مهم‌ترین معیارهای انتخاب ژن‌های کاندید هم‌پوشانی با QTL‌های مرتبط با مقاومت به تنش خشکی است. برای شناسایی واریانت‌های موجود در محدوده این QTLها در برنج لیست این QTLها از

FastQC کیفیت بالای توالی‌یابی را تأیید کرد. پس از حذف خوانش‌های دارای کیفیت پایین و همچنین خوانش‌های دارای توالی آداپتورها یا پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic، تعداد توالی‌ها در رقم هاشمی از ۲۰۸۷۱۲۲۴ به ۱۶۲۷۸۳۲۳ و در رقم موتانت از ۲۰۷۴۹۲۹۵ به ۱۷۹۱۰۸۳۵ رسید. پس از هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع *Oryza sativa Japonica* نسخه IRGSP-1.0 با استفاده از نرم‌افزار BWA، بیش از ۹۵ درصد خوانش‌ها در هر دو رقم با ژنوم مرجع هم‌ردیف شدند. درصد هم‌ردیفی و میانگین عمق خوانش برای هر رقم در جدول ۲ نشان داده شده است.

درصد بالای هم‌ردیفی داده‌ها با ژنوم مرجع نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب داده‌های خام و دقت بالا در مراحل پیش‌پردازش و پالایش است. مطالعات مشابه در برنج نیز مقادیر هم‌ردیفی بالاتر از ۹۰ درصد را به‌عنوان شاخص استاندارد کیفیت داده‌ها گزارش کرده‌اند (Mahesh *et al.*, 2020). بر اساس بررسی‌های کیم و همکاران، دستیابی به هم‌ردیفی با کیفیت بالا نه تنها احتمال بروز خطا در فرآیند فراخوانی واریانت‌ها را کاهش می‌دهد، بلکه موجب افزایش دقت در تعیین موقعیت جهش‌ها، به‌ویژه در نواحی تکراری ژنوم، می‌شود (Kim *et al.*, 2022). همچنین به گفته وانگ و همکاران، میانگین عمق پوشش در محدوده ۵ تا ۱۰ برابر (X) برای مطالعات ژنومیک گیاهان، مقدار مناسبی جهت شناسایی واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک به شمار می‌رود (Wang *et al.*, 2021). بر این اساس، کیفیت داده‌های حاصل در پژوهش حاضر برای انجام تحلیل‌های بعدی مناسب ارزیابی شد.

تفرق همزمان نشان می‌دهند شناسایی شود. ژنوتایپینگ از طریق توالی‌یابی سنگر انجام شد.

طراحی آغازگر برای ژنوتایپینگ

طراحی آغازگرها برای انجام ژنوتایپینگ در Primer3 (v. 0.4.0) انجام شد. آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که موتاسیون مورد نظر در وسط قطعه تکثیری واقع شده باشد. برای اطمینان از صحت طراحی آغازگر بلاست (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) آن‌ها صورت گرفت. سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد و آماده‌سازی آن‌ها طبق دستورالعمل ارائه شده توسط این شرکت صورت گرفت. جدول ۱ توالی و مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

با توجه به تک‌باند بودن محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد و غلظت مناسب تأیید شده با دستگاه اسپکتروفتومتر، ۲۵ مایکرولیتر از محصولات PCR به همراه پرایمرهای مربوطه برای توالی‌یابی سنگر به شرکت نیازن ارسال شد. قطعه تکثیر شده ابتدا در ژنوم مادری و موتانت توالی‌یابی شد و پس از هم‌ردیفی و تأیید وجود موتاسیون، محصولات PCR حاصل از تکثیر ژنوم ۸ گیاه حساس و ۸ گیاه مقاوم با پرایمر ژن‌های کاندید برای توالی‌یابی ارسال شدند.

یافته‌های پژوهش

هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع

داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم هاشمی و موتانت شامل دو فایل خوانش رفت و برگشت برای هر ژنوم با پسوند fastQC به دست آمد. کنترل کیفیت داده‌ها با نرم‌افزار

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژنوتایپینگ

Table 1. Sequence of the primers used for genotyping

طول قطعه تکثیر PCR product length	دمای اتصال Annealing Temperature	توالی پرایمر Primer sequences	نام ژن Gene name
462	58	F: ATGGGTTTGTGTTTCAGAGC R: TTCAAAGCGCAATACGCTAC	Os11g0493000
447	58	F: ATCAAGTGCACCGTGATGGA R: TGACACGTAACACAGGTTTTG	Os11g0539500
461	58	F: TTGATTGCTCTTTCCTCTGC R: GATTTGACATGCATCGAACC	Os08g0133700

جدول ۲. خلاصه اطلاعات توالی‌یابی و آمار هم‌ردیفی ژنوم برنج

Table 2. Summary of sequence data and mapping statistics on the rice genome

Mutant	Hashemi	
20749295	20871224	تعداد کل توالی‌های کوتاه (Total reads)
17910835	16278323	تعداد خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنوم مرجع (Total reads mapped)
95.70%	97.73%	درصد هم‌ردیفی (Genome coverage (%))
5.61	5.64	میانگین عمق خوانش یا پوشش‌دهی (Sequencing depth)

شد که توزیع واریانت‌ها در درون کروموزوم‌ها نیز یکنواخت نیست. وقوع مناطق ژنومی با تفاوت معنی‌دار در تراکم پلی‌مورفیسیم‌های DNA پیش از این نیز در برنج و سایر گیاهان گزارش شده است (Arai-Kichise *et al.*, 2011; Caicedo *et al.*, 2007; Feltus *et al.*, 2004; Nordborg *et al.*, 2005; Subbaiyan *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013a).

جدول ۴. نرخ واریانت‌ها در کروموزوم‌های ژنوم موتانت

Table 4. Variants rate details on the mutant genome chromosomes

Chromosome	Length	Variants	Variants rate
1	43,270,923	6,450	6,708
2	35,937,250	5,776	6,221
3	36,413,819	8,103	4,493
4	35,502,694	5,393	6,583
5	29,958,434	5,465	5,481
6	31,248,787	4,080	7,659
7	29,697,621	5,377	5,523
8	28,443,022	4,481	6,347
9	23,012,720	3,664	6,280
10	23,207,287	5,016	4,626
11	29,021,106	15,039	1,929
12	27,531,856	4,233	6,504
Total	373,245,519	73,077	5,107

بیشترین تراکم واریانت‌ها در کروموزوم ۱۱ احتمالاً ناشی از حضور خوشه‌ای از ژن‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی و ژن‌های تنظیم‌کننده بیان در این کروموزوم است (Liu *et al.*, 2023). نواحی بالادست ژن‌ها معمولاً شامل عناصر تنظیمی هستند که می‌توانند به‌طور مستقیم بر میزان رونویسی و تنظیم بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند؛ بنابراین تجمع واریانت‌ها در این نواحی ممکن است با تغییر در سطح بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی مرتبط باشد (Zhao *et al.*, 2022). در مطالعه سینگ و همکاران نیز گزارش شده است که بخش قابل‌توجهی از QTL‌های مرتبط با تحمل به تنش خشکی در گیاه برنج در کروموزوم‌های ۸ و ۱۱ قرار دارند که این یافته با نتایج

شناسایی SNP‌ها و InDel‌ها

بعد از هم‌ردیفی با ژنوم مرجع و انجام فیلترینگ‌های پیش فرض برنامه BWA، واریانت‌های موجود در موتانت و ناموجود در رقم هاشمی استخراج شدند. در این مطالعه تعداد ۷۳،۰۷۷ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد.

بیشترین تعداد پلی‌مورفیسیم موجود در رقم موتانت از نوع SNP و پس از آن بیشترین واریانت‌ها به ترتیب از نوع MNP، DEL و INS می‌باشد. حدود ۱۸ درصد از SNP‌های شناسایی شده، در مطالعات پیشین گزارش شده بودند (McNally *et al.*, 2009). تعداد واریانت‌ها بر اساس نوع پلی‌مورفیسیم در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول ۳. تعداد واریانت‌ها بر اساس نوع واریانت

Table 3. Number variants by type

Type	Total
SNP	58,969
MNP	8,551
INS	1,898
DEL	2,268
MIXED	1,391
Total	73,077

توزیع SNP‌ها و InDel‌ها در ژنوم

تعداد SNP‌ها و InDel‌های شناسایی شده و فراوانی آن‌ها (تعداد در هر ۱۰۰ کیلو جفت‌باز) در بین کروموزوم‌ها متفاوت است. توزیع واریانت‌ها در کروموزوم‌های موتانت نسبت به هاشمی و نرخ واریانت در هر کروموزوم در جدول (۴) نشان داده شده است. بیشترین تعداد SNP و InDel در کروموزوم ۱۱ و کمترین تعداد در کروموزوم ۹ شناسایی شد. علاوه بر این مشاهده

1 Multiple Nucleotide Polymorphism

2 Deletion

3 Insertion

حاشیه‌نویسی SNPها و InDelها

در این پژوهش از حاشیه‌نویسی ژنوم IRGSP-1.0 برای مشخص شدن تأثیر توزیع واریانت‌ها بر ویژگی‌های مختلف ژنومی استفاده کردیم. موقعیت SNPها و InDels در یک ژنوم می‌تواند بر بیان و عملکرد ژن تأثیر بگذارد. پلی‌مورفیسم‌های موجود در نواحی کدکننده دارای اهمیت ویژه‌ای هستند زیرا ممکن است عملکرد پروتئین را تغییر دهند. علاوه بر این، تغییرات موجود در توالی‌های تنظیمی نیز مهم هستند؛ به دلیل این که می‌توانند بیان ژن را تقویت یا سرکوب کنند و در نتیجه عملکرد ژن را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین، کشف پلی‌مورفیسم مرتبط با تغییرات عملکردی ژن‌ها دارای اهمیت زیادی است. مطالعات زیادی تأثیر بالای وقوع واریانت در نواحی تنظیمی بالادست و پایین دست در بیان ژن در حیوانات را نشان داده‌اند (Landry et al., 2007; Wittkopp et al., 2008; Wray, 2007). چند مطالعه در گیاهان نیز اهمیت چنین واریانت‌هایی را در تنظیم بیان ژن و تأثیر بر صفات زراعی گزارش کرده‌اند (Keurentjes et al., 2007).

نتایج مستندسازی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی نشان دادند که بیشترین واریانت‌ها در نواحی بالادست ژن‌ها رخ داده‌اند. پس از آن بیشترین واریانت‌ها به ترتیب در پایین دست و نواحی بین ژنی واقع شده‌اند. میزان آثار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی در شکل ۱ نشان داده شده است. از تعداد کل واریانت‌ها ۲۸/۱۱۳ درصد در نواحی پایین دست ۱/۷۹۹ درصد در نواحی اگزونی، ۲۴/۱۷۶ درصد در نواحی بین ژنی، ۳/۲۵ درصد در نواحی اینترونی، ۱۲/۱۳۵ درصد در نواحی ترنسکرپت، ۲۹/۰۲۶ درصد در نواحی بالادست، ۰/۸۸ درصد در نواحی 3'UTR و ۰/۵۲ درصد در نواحی 5'UTR قرار گرفته‌اند. در این مطالعه واریانت‌هایی که در ناحیه اگزون واقع شده‌اند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

پژوهش حاضر هم‌راستا است (Singh et al., 2021). به‌طور کلی، توزیع مکانی و تراکم واریانت‌ها می‌تواند نشانه‌های ژنومی ارزشمندی از جایگاه‌های مؤثر بر تحمل به خشکی در رقم موتانت ارائه دهد.

آنالیز SNPها و InDelها

در رقم موتانت بیشترین تعداد چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی از نوع جهش جایگزینی انتقالی^۱ (A/G و C/T) با ۵۲،۳۸۰ جهش بود و تعداد چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی از نوع جهش جایگزینی متقاطع (A/C، A/T، G/T و G/C) ۲۲،۸۰۵ عدد بود. نسبت جهش انتقالی به متقاطع (Ts/Tv) در رقم موتانت ۲/۳ بود (جدول ۵). غلبه‌ی جهش‌های انتقالی یکی از پدیده‌های رایج در ژنوم گیاهان خودگشن مانند برنج است که این امر به پایداری بیشتر این نوع تغییرات در فرآیند همانندسازی DNA نسبت داده می‌شود (Li et al., 2022). نسبت به‌دست‌آمده‌ی جهش انتقالی به متقاطع (Ts/Tv ≈ 2.3) در این پژوهش، با مقادیر گزارش شده در مطالعات ژنوم کامل برنج توسط وانگ و همکاران (Wang et al., 2020) و هوانگ و همکاران (Huang et al., 2021) هم‌خوانی دارد. این نسبت معمولاً نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب داده‌های واریانت و صحت بالای هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع است (Kawakami et al., 2018). به‌طور کلی، نسبت بالاتر از دو بیانگر آن است که جهش‌های طبیعی‌تر و زیست‌پذیرتر در فرآیند پرتوتایی و انتخاب نسل‌های بعدی در رقم موتانت تثبیت شده‌اند (Li et al., 2022; Wang et al., 2020).

جدول ۵. تعداد و نسبت چند ریختی‌های تک نوکلئوتیدی بر

اساس نوع جهش جایگزینی

Table 5. Number and ratio of single nucleotide polymorphisms based on the type of substitution mutation

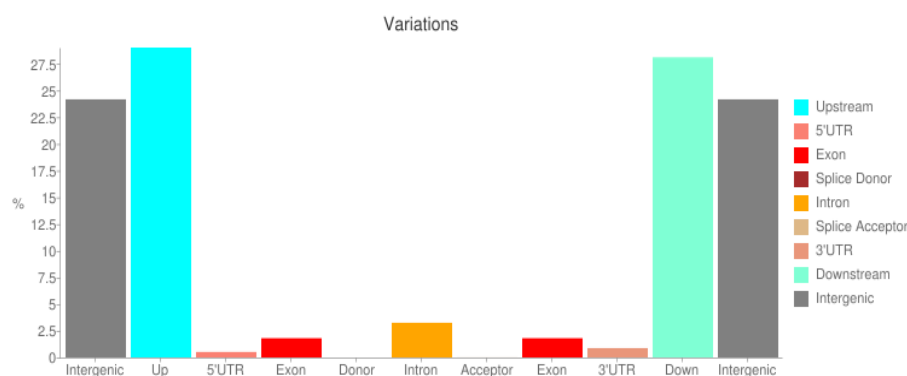
Transitions	52,380
Transversions	22,805
Ts/Tv ratio	2.2969

۱ Transitions

۲ Transversions

۳ Transitions/ transversions

۴ Annotation



شکل ۱. درصد واریانت‌ها در نواحی مختلف ژنوم موتانت

Figure 1. Variant percentage in different regions of the mutant genome

ژن‌های کاندید و واریانت‌های موجود در محدوده QTL‌های تحمل به تنش خشکی

پس از بررسی و فیلتر کردن واریانت‌ها بر اساس آنچه ذکر شد، مطالعه کارکرد ژن‌ها و بررسی هم‌پوشانی با QTL‌های مرتبط با مقاومت به خشکی و در نظر گرفتن اسکور LOD^۱ هر QTL، مطالعه ارتولوگ ژن‌های دارای واریانت، مقایسه واریانت‌ها با دیتابیس واریانت‌های برنج، در نظر گرفتن تأثیر واریانت بر ژن و بر محصول آن و مطالعه ارتباط واریانت‌ها با صفات تحمل به خشکی، بررسی محل بیان ژن‌ها در گیاه و محصول بیان ژن، جستجوی عملکرد مولکولی ژن و فرایندهای بیولوژیکی که در آن‌ها دخیل است، در نهایت سه ژن برای مرحله ژنوتایپینگ کاندید شدند. در جدول (۶) نام ژن کاندید، نام ژن در سیستم LOC، شناسه SNP که در ژن رخ داده است و سایر مشخصات این ژن‌ها قید شده است.

نتایج حاصل از ژنوتایپینگ

نتیجه انجام توالی‌یابی قطعات حاصل از تکثیر ژنوم رقم موتانت و مادری با پرایمرهای سه ژن کاندید و هم‌ردیفی با توالی رفرنس، وجود موتاسیون مورد نظر در دو تا از سه ژن کاندید یعنی ژن Os11g0493000 (شکل ۲) و ژن Os08g0133700 (شکل ۴) را تأیید کرد.

چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی هتروزیگوس و هموزیگوس

در ژنوم مورد مطالعه تعداد واریانت‌های هتروزیگوس ۴۶۶۰۸ عدد و هموزیگوس ۲۵۳۵۵ بود. در این مطالعه برای جستجوی ژن‌های کاندید مقاومت به خشکی واریانت‌های هموزیگوت را جدا شده و در آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. چون برنج خودگشن است و لاین موتانت مورد مطالعه چندین نسل خودگشن شده است انتظار می‌رود واریانت‌های واقعی هموزیگوت باشند. در گونه‌های خودگشن نظیر برنج، وقوع غالب واریانت‌های هموزیگوس امری طبیعی است، زیرا فرایند خودگشنی منجر به حذف تدریجی ال‌های ناهمسان و تثبیت ژنوتیپ‌ها می‌شود (Mansueto *et al.*, 2017). در مطالعات مشابه، نسبت واریانت‌های هموزیگوس در موتانت‌های پرتوده‌ی شده بین ۵۵ تا ۷۰ درصد گزارش شده است (Jain *et al.*, 2019; Furuta *et al.*, 2023). نسبت بالاتر هتروزیگوس‌ها در این مطالعه می‌تواند نتیجه‌ی جهش‌های جدید یا ساختارهای ژنومی پیچیده در مناطق خاصی از ژنوم باشد. از دیدگاه ژنتیکی، تمایز میان واریانت‌های هموزیگوس و هتروزیگوس برای شناسایی جهش‌های پایدار مرتبط با صفات پیچیده‌ای همچون تحمل به خشکی اهمیت زیادی دارد، زیرا تنها واریانت‌های تثبیت‌شده قابلیت انتقال پایدار به نسل‌های بعدی را دارند (Wang *et al.*, 2021).

^۱ Logarithm of the odds

جدول ۶. ژن‌های کاندید تحمل به خشکی و مشخصات آن‌ها

Table 6. Candidate genes for drought tolerance and their characteristics

Candidate genes	1	2	3
Gene name	Os11g0493000	Os11g0539500	Os08g0133700
LOC	LOC_Os11g30060.1	LOC_Os11g33300.1	LOC_Os08g04010.1
SNP ID	rs54404362	vcZ2HKGWT	10801921126
Expression	Shoots, flower, embryo, endosperm	expressed in all tissues	low expression, all tissues
Variant	frameshift (stop codon lost)	stop gained(Q→stop codon)	stop gained(S→stop codon)
Interesting	truncated protein turned to a complete protein	truncated protein	truncated protein
Gene Product Name	NBS-LRR type disease resistance protein Hom-B, putative, expressed	O-methyltransferase, putative, expressed	-Yaminoethanethiol dioxygenase, putative, expressed
Molecular function	protein binding	transferase activity, protein binding	catalytic activity
Biological process	response to stress	metabolic process, cellular process	metabolic process

HP1	TAGAATGAGCAAAGTGATTACTGGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	161
MP1	TGGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	197
Os11g0493000	TAGAATGAGCAAAGTGATTACTGGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	900
MU	TGGAATGAGCAAAGTGATTACTCGAAGTCGTTGTGTATGCCGATTTTGCCTCTACGCGT	900
	* *****	
HP1	TGTGACATTATAGTAACTACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGTTAGTTCAGACAATACCA	221
MP1	TGTGACATTATAGTAACTACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGTTAGTTCAGACAATACCA	257
Os11g0493000	TGTGACATTATAGTAACTACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGTTAGTTCAGACAATACCA	960
MU	TGTGACATTATAGTAACTACTCGGAGTGAGGCAGTGGCAAGTTAGTTCAGACAATACCA	960

HP1	TTCTACAATTTAGACTACTTA-ATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	280
MP1	TTCTACAATTTAGACTACTTAAATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	317
Os11g0493000	TTCTACAATTTAGACTACTTA-ATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	1019
MU	TTCTACAATTTAGACTACTTAAATCCTGATGACAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG	1020

شکل ۲. HP1: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۱ (Os11g0493000)، MP1: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۱، Os11g0493000: توالی ژن رفرنس، MU: توالی ژن موتانت مورد انتظار

Figure 2. HP1: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

1, MP1: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene 1,

Os11g0493000: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

Os11g0539500	ATGTTCCAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	1440
MU	ATGTTCTAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTATCACATAGGCA	1440
HP2	ATGTTCTAATCCATTCCACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTACCACATAGGCA	120
MP2	ATGTTCTAANCCNTTCNACCAGCGGACGCTGTTCTACTCAAAGTACGTACCACNTAGGCA	126

شکل ۳. HP2: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۲ (Os11g0539500)، MP2: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۲، Os11g0539500: توالی ژن رفرنس، MU: توالی موتانت مورد انتظار

Figure 3. HP2: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

2, MP2: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene 2,

Os11g0539500: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

HP3	ATTGNAATATTCTGCTTACCAACATCGGCGGNTATTCTCTCCATGATCATCCGGNAATG	402
Os08g0133700	ATTGGAATATTCTGCTTACCAACGTCGGCGGTCATTCTCTCCATGATCATCCGGGAATG	1428
MU	ATTGGAATATTCTGCTTACCAACGTCAGGCGGTCATTCTCTCCATGATCATCCGGGAATG	1428
MP3	ATTGNAATATTCTGCTTACCAACGNANGCGNCATTCTCTCCATGATCATCCGGNAATG	390

شکل ۴. HP3: توالی حاصل از تکثیر ژنوم هاشمی با پرایمرهای ژن کاندید ۳ (Os08g0133700)، MP3: توالی حاصل از تکثیر ژنوم موتانت

با پرایمر ژن کاندید ۳، Os08g0133700: توالی ژن رفرنس، MU: توالی موتانت مورد انتظار

Figure 4. HP3: The sequence obtained from the amplification of the Hashemi genome with primers of candidate gene

3, MP3: The sequence obtained from the amplification of the Mutant genome with primers of candidate gene3,

Os08g0133700: Reference gene sequence, MU: Expected mutant gene sequence

مولکولی اتصال به پروتئین است و در فرایند بیولوژیکی^۲ پاسخ به استرس نقش دارد. نام محصول این ژن پروتئین مقاومت به بیماری NBS-LRR^۳ گزارش شده. در مطالعات محل بیان این ژن در ساقه، گل، جنین و آندوسپرم ذکر شده است. این ژن دارای یک رونوشت^۴ است.

در توالی ژن موتانت سه واریانت مشاهده شد. واریانت اول از نوع SNP است و با تبدیل نوکلئوتید A به G باعث حذف استاپ کدون قبل از orf رمز کننده پپتید شده است. واریانت دوم نیز SNP و با تبدیل G به C باعث تبدیل اسید آمینه قطبی تریتوفان (w) به اسید آمینه قطبی سرین (s) شده است؛ و واریانت سوم از نوع اینترشن بوده و اضافه شدن یک نوکلئوتید A و تغییر توالی TAATC به TAAATC باعث تغییر فریم شیفت و از دست رفتن یک استاپ کدون شده است. این واریانت در دیتابیس واریانت‌های برنج با شناسه rs54404362 ثبت شده است. بنا بر آنچه ذکر شد پیش‌بینی می‌شود ژن موتانت با حذف دو استاپ کدون، یک پروتئین کامل با پپتیدی به طول ۸۳۴ اسید آمینه تولید کند (شکل ۵). نتیجه هم‌ردیفی توالی پپتیدی ژن موتانت مشابهت بسیار بالایی با توالی پپتید RPP13-Like protein1 (*Oryza glaberrima*) نشان داد (شکل ۶). RPP13 به عنوان پروتئین‌های مقاومتی گزارش شده است که در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان مختلف نقش دارد (Sakariya et al. 2024, Villet et al., 2015). RPP13 یک شبه پروتئین دخیل در مقاومت به بیماری و حاوی دومین NB-ARC است. بسیاری از پروتئین‌های موثر در مقاومت، دارای یک دومین مرکزی NB-ARC هستند. این پروتئین نقش مهمی در مقاومت به بیماری‌های مختلف گیاهی از جمله

بررسی ژن‌های کاندید تحت تنش خشکی

نتیجه انجام توالی‌یابی قطعات حاصل از انجام PCR ژنوم ۸ لاین حساس و ۸ لاین مقاوم F2- حاصل از ارزیابی‌های فنوتیپی بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد برنج IIRI - با پرایمرهای دو ژن کاندید نهایی، تنها در ژن Os11g0493000 تفرق واریانت مشهودی در لاین‌های حساس و مقاوم مشاهده شد (جدول ۷).

جدول ۷. مقایسه نقاط دارای موتاسیون در توالی تکثیر شده

لاین‌های حساس (S1 تا S8) و لاین‌های مقاوم (T1 تا T8) با پرایمرهای ژن کاندید ۱ (با سه موتاسیون) و ژن کاندید ۲ در کنار توالی رقم موتانت و هاشمی و توالی ژن رفرنس

Table 7. Comparison of mutation sites in the amplified sequences of sensitive lines (S1 to S8) and resistant lines (T1 to T8) using primers for Candidate Gene 1 (with three mutations) and Candidate Gene 2, alongside the sequences of the mutant Variety, Hashemi variety, and the reference gene sequence

	Os11g0493000(1)	Os11g0493000(2)	Os11g0493000(3)	Os08g0133700
Reference	A	G	A-A	G
Hashemi Mutant	A	G	A-A	G
T1	G	C	AAA	N
T2	G	C	AAA	C
T3	G	C	AAA	G
T4	A	G	A-A	C
T5	G	C	AAA	G
T6	G	C	AAA	G
T7	A	G	A-A	N
T8	G	C	AAA	C
S1	A	G	A-A	G
S2	A	G	A-A	G
S3	A	G	A-A	C
S4	A	G	A-A	C
S5	G	C	AAA	C
S6	A	G	A-A	C
S7	A	G	A-A	N
S8	G	C	AAA	N

ژن Os11g0493000 (LOC_Os11g30060.1)

ژن Os11g0493000 روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد و طول ژن ۴۹۹ نوکلئوتید است. این ژن پروتئینی به طول ۷۰ اسید آمینه را رمز کرده است. ساختار این ژن از یک اگزون و دو اینترون تشکیل شده است.

بررسی انوتیشن ژن در در دیتابیس‌های Ensembl و rapdb نشان می‌دهد که این ژن دارای عملکرد

^۱ Molecular function

^۲ Biological process

^۳ Nucleotide-binding site and leucine-rich repeat

^۴ Transcript

^۵ Recognition of *Peronospora Parasitica* 13-like

سفیدک پودری دارد (Eddy *et al.*, 2000 Cheng *et al.*, 2018; Bittner-)

Hashemi gene:TTGGATAATGTTT**A**GAATGAGCAAAGTGATTACT**G**GAAAGTCGTT.....AGACTACTTAATCCTGATGA
 CAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG TTTGTTGAGCATGATAATGTCAGTCCAGCAAACCTAGTA.....
 Hashemi peptid:L D N V **S**top N E Q S D Y W K S..... D Y L I L Met T A G C Y S S K Q R L L S Met I Met S V Q Q T **S**top
 Mutant gene:TTGGATGATGTTT**G**GAATGAGCAAAGTGATTACT**C**GAAAGTCGTT..... AGACTACTTA**A**ATCCTGATGA
 CAGCTGGTTGTTATTCAAGCAAACAGCG TTTGTTGAGCATGATAATGTCAGTCCAGCAAACCTAGTA.....
 Mutant peptid:L D D V **W** N E Q S D Y S K S D Y L **N P D D S W L L F K Q T A F V E H D N V S P A N L V**.....

شکل ۵. مقایسه توالی ژن کاندید Os11g0493000 و پیش بینی پپتید آن در ژنوم هاشمی و موتانت

Figure 5. Comparison of Os11g0493000 Candidate genes sequence and its peptid prediction in Hashemi and Mutant genome

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MUTANT	MMTLEGSRIIGGCMSVLAIVGMGGLGKTTLAQLVYNDPKVRQAFDLFGWVCVSEHFDVNNI	60
RPP13-like	MMTLEGSRIIGGCMSVLAIVGMGGLGKTTLAQLVYNDPKVRQAFDLFGWVCVSEHFDVNNI	60
MUTANT	TRKILSSIAKRNCDYIQSSELQGGLENLIKDKRVFLVLDVWNEQSDYSKSLCMPIFAST	120
RPP13-like	TRKILSSIAKRNCDYIQSSELQGGLENLIKDKRVFLVLDVWNEQSDYKSLCMPIFAST	120
MUTANT	RCDIIVTTRSEAVARLVQTIPIFYNDYLNPDOSWLLFKQTAFVEHDNVSPANLVEIGQRI	180
RPP13-like	RCDIIVTTRSEAVARLVQTIPIFYNDYLNPDOSWLLFKQTAFVEHDNVSPANLVEIGQRI	180
MUTANT	AKKCQGLPLALKTLGSVLRFETNMKWRDVLQSELWDLERSQNEVLPALLESYKHMPMHL	240
RPP13-like	AKKCQGLPLALKTLGSVLRFETNMKWRDVLQSELWDLERSQNEVLPALLESYKHMPMHL	240
MUTANT	KLCFVLSLSYLKDYTFDESIVVWLWKSLLHQCDGTDNSNEIGGLYFTQLVQRSLIQQVD	300
RPP13-like	KLCFVLSLSLYPEKDYTFDESIVVWLWKSLLHQCDGTDNSNEIGGLYFTQLVQRSLIQQVD	300
MUTANT	THGRMAIHDLVHDLACFLAGEEFFRLEEDGYVEIPKGARCMSPHPQCKRSTQISNASQ	360
RPP13-like	THGRMAIHDLVHDLACFLAGEEFFRLEEDGYVEIPKGARYMSIMPHQCKRSTQISNASQ	360
MUTANT	SLRVIIILIRINIKNPEALFMNCKKFKIITQVIDDSFANVLLDFMGDMKLLRHFRILRSCN	420
RPP13-like	SLRVIIILIRINIKNPEALFMNCKKFKIITQVIDDSFANVLLDFMGDMKLLRHFRILRSCN	420
MUTANT	EVKLVISDSMSQQFNLTNCEAYS LHGIGRLANLQNLNPIHLWKCGCYLRELRMNKIR	480
RPP13-like	EVKLVISDSMSQQFNLTNCEAYS LHGIGRLANLQNLNPIHLWKCGCYLRELRMNKIR	480
MUTANT	RLHIYGLCNVSSIQDVNEAHLHSSKDLLELDFESGGICKVHKEEADVNAISTVSGGS	540
RPP13-like	RLHIYGLCNVSSIQDVNEAHLHSSKDLLELDFESGGICKVHKEEADVNAISTVSGGS	540
MUTANT	ILESLRPHHQSLKVLRMKNLNEVWYPSWLGSAFSLTKLRLENCQSQHLPTLGELPSLK	600
RPP13-like	ILESLRPHHQSLKVLRMKNLNEVWYPSWLGSAFSLTKLRLENCQSQHLPTLGELPSLK	600
MUTANT	SIDIRQMEYVENIGRVFCSLDPSVKGFRSLAHLRFQDMNRFSEWSEVHDGEFSSLETLLI	660
RPP13-like	SIDIRQMEYVENIGRVFCSLDPSVKGFRSLAHLRFQDMNRFSEWSEVHDGEFSSLETLLI	660
MUTANT	WSASELSSLPVFPSSLRSELCDCCKNLVTFPASATLQILSISSECKLKEPALPSLRSL	720
RPP13-like	WSASELSSLPVFPSSLRSELCDCCKNLVTFPASATLQILSISSECKLKEPALPSLRSL	720
MUTANT	KLSGCESLVAUGHFPSLTVLHMSTEFEEVHLKLMNLHLKLEELSISSDTMKLNLEPHS	780
RPP13-like	KLSGCESLVAUGHFPSLTVLHMSTEFEEVHLKLMNLHLKLEELSISSDTMKLNLEPHS	780
MUTANT	LPLLRELELVCPNLQNCDALASLSSLEILCVNRCSPQLRVPNSLQSQLEKLYSP	834
RPP13-like	LPLLRELELVCPNLQNCDALASLSSLEILCVNRCSPQLRVPNSLQSQLEKLYSP	834

شکل ۶. هم‌ردیفی توالی پپتیدی ژن کاندید Os11g0493000 در لاین موتانت با توالی پپتید RPP13-Like protein1 (*Oryza glaberrima*)

Figure 6. Alignment of the peptide sequence of the candidate gene Os11g0493000 in the mutant line with the peptide sequence of RPP13-Like Protein1 (*Oryza glaberrima*)

پروتلین و بسته‌شدن روزنه‌ها در گیاه، تحمل به خشکی را در رقم موتانت افزایش داده‌اند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

ژنوم موتانت حاوی پلی مورفیسم در ژن RPP13-Like Os11g0493000، توالی پروتئینی مشابه *protein1(oryza glaberrima)* را رمز می‌کند. به نظر می‌رسد شبه پروتئین RPP13 علاوه بر تأثیر در مقاومت به تنش‌های زیستی، در تنش‌های غیر زیستی نیز نقش دارد. امید است بتوان با القاء موتاسیون هدفمند یا استفاده از تکنیک‌های ویرایش ژنوم با هدف تولید این پروتئین در ارقام برنج حساس به تنش خشکی، به ارقامی دست یافت که علاوه بر داشتن خصوصیات مطلوب مورد نظر، متحمل به تنش خشکی نیز باشند. با توجه به شناسایی و طراحی پرایمر برای ژن مذکور در رقم موتانت هستی، می‌توان این ژن را به ارقام تجاری حساس به تنش خشکی با استفاده از تکنیک انتخاب به کمک نشانگر منتقل کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مادی و معنوی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. قسمت مولکولی پژوهش در آزمایشگاه بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور و قسمت مزرعه‌ای در فارم موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت انجام شده است. سپاسگزار پشتیبانی و حمایت استادان و بزرگوارانی هستیم که در پیشبرد این پروژه همکاری و همراهی داشته‌اند و قطعاً بدون حضور آنان انجام این پژوهش ممکن نبود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

پروتئین‌های NBS-LRR با درک مولکول‌های سیگنال‌دهنده‌ی تنش (مانند ROS و ABA) و فعال‌سازی مسیرهای دفاعی از جمله MAPK cascade، نقش مهمی در القای تحمل به تنش ایفا می‌کنند (Li et al., 2023). در گیاهان برنج، افزایش بیان ژن‌های NBS-LRR در شرایط خشکی موجب تنظیم آسمزی از طریق کنترل تجمع پروتئین‌های حفاظت‌کننده از سلول مانند LEA، دیرین‌ها (Dehydrins) و پروتلین می‌شود (Fang et al., 2022). به علاوه، ارتباط این ژن با مسیر هورمون آبسزیک اسید (ABA) نیز قابل توجه است. مطالعات جونگ و همکاران و همچنین کومار و همکاران نشان داده‌اند که برخی از اعضای خانواده NBS-LRR از طریق تعامل با فاکتورهای رونویسی WRKY و DREB2A، موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بستن روزنه‌ها، حفظ پتانسیل آبی سلول و کاهش تبخیر می‌شوند. بنابراین، تغییرات ایجادشده در این ژن احتمالاً منجر به القای پاسخ‌های سریع‌تر دفاعی در برابر تنش خشکی شده است (Kumar et al., 2022; Jung et al., 2020).

هم‌چنین، شباهت پپتیدی بالای ژن موتانت با RPP13-like protein در گونه *Oryza glaberrima* که نقش آن در مقاومت به سفیدک پودری شناخته شده است، نشان می‌دهد که سازوکارهای مشترکی میان پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود دارد. این موضوع با مدل "cross-talk" در سیگنال‌دهی دفاعی هم‌خوان است، جایی که فعال‌سازی یک مسیر مقاومت به تنش زیستی می‌تواند موجب افزایش تحمل به تنش خشکی نیز شود (Bertioli et al., 2022; Seo et al., 2022). در مجموع، جهش‌های شناسایی‌شده در Os11g0493000 احتمالاً باعث افزایش پایداری، بیان یا فعالیت پروتئین NBS-LRR شده‌اند که در نتیجه با تقویت مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی، افزایش محتوای

References

Arai-Kichise, Y., Shiwa, Y., Nagasaki, H., Eban, K., Yoshikawa, H., Yano, M., & Wakasa, K.

(2011). Discovery of genome-wide DNA polymorphisms in a landrace cultivar of

- Japonica* rice by whole-genome sequencing. *Plant Cell Physiol*, 52, 274–282. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr003>.
- Bertioli, D. J., Jenkins, J., Stasolla, C., & Wang, X. (2022). NBS-LRR gene family expansion and diversification in plants, evolutionary and functional perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 847211. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.847211>
- Bittner-Eddy, P. D., Crute, I. R., Holub, E. B., & Beynon, J. L. (2000). RPP13 is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant*, 21(2), 177–88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00664.x>.
- Caicedo, A. L., Williamson, S. H., Hernandez, R. D., Boyko, A., Fledel-Alon, A., York, T. L., Polato, N. R., Olsen, K., M., Nielsen, R., McCouch, S. R., Bustamante, C. D., & Purugganan, M. D. (2007) Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genetics*, 3, 1745–1756. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030163>.
- Cheng, J., Fan, H., Li, L., Hu, B., Liu, H., & Liu, Z. (2018). Genome-wide Identification and Expression Analyses of RPP13-like Genes in Barley. *BioChip*, 12, 102–113. <https://doi.org/10.1007/s13206-017-2203-y>.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, snpeff, SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80–92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- Ebadi, A. A., & Hallajian, M. T. (2024). Release of a new rice cultivar, Hasti, derived from Hashemi landrace The final project report with registration number 65362, Rice Research Institute of Iran-Rasht. (in persian)
- Fang, Y., Liao, K., Du, H., Xu, Y., Song, H., Li, X., Xiong, L., & Zhao, Y. (2022). NBS-LRR-mediated drought tolerance and osmotic adjustment in rice. *Plant Science*, 320, 111297. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111297>
- Feltus, F. A., Wan, J., Schulze, S. R., Estill, J. C., Jiang, N., & Paterson, A. H. (2004). An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Research*, 14, 1812–1819. <https://doi.org/10.1101/gr.2479404>.
- Furuta, T., Uehara, K., & Kobayashi, N. (2023). Mutation spectra induced by gamma irradiation in rice genomes revealed by whole-genome resequencing. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1170389. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1170389>
- Hayashi, K., Yoshida, H., & Ashikawa, I. (2006). Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 251–260. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0290-6>
- Huang, X., Lu, T., & Han, B. (2013). Resequencing rice genomes, an emerging new era of rice genomics. *Trends in Genetics*, 29, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.001>.
- Huang, X., Zhao, Y., & Li, J. (2021). Patterns of transition and transversion polymorphisms in the rice genome. *The Plant Genome*, 14(3), e20149. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20149>
- IRRI (International Rice Research Institute). (2006). Direct seeded rice, a low cost establishment technology. IRRI Rice factsheet. Available at http://www.narc.org.np/rice_knowledge_bank/fact.
- IRRI (International Rice Research Institute). (2014). Standard Evaluation System for Rice (SES). Loss Banos, Leguna, Philippines.
- Jain, R., Sharma, R., & Singh, N. (2019). Analysis of homozygous and heterozygous SNPs in gamma-irradiated rice mutants using next-generation sequencing. *Plant Physiology Reports*, 24(4), 612–621. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00489-7>
- Jain, S. A., Jesus, F., Marchioro, G., & Araújo, E. (2013b). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology*, 33, 753–756. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>.
- Jain., K., Moharana, K. C., Shankar, R., Kumari, R., & arg, R. (2013a). Genomewide discovery of DNA polymorphisms in ricecultivars with contrasting drought and salinity stress response and their functional relevance. *Plant Biotechnology*, 12, 253–264. <https://doi.org/10.1111/pbi.12133>.
- Jung, H., Kim, J., Lee, S., Park, H., Choi, Y., & Seo, P. J. (2020). Genome-wide identification of NBS-LRR genes in rice and their roles in drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 20(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02621-0>
- Kawakami, K., Matsuda, K., & Nagano, A. J. (2018). Transition/transversion ratio as an indicator of sequencing error and variant calling quality in plants. *DNA Research*, 25(5), 515–523. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy024>
- Keurentjes, J. J., Fu, J., Terpstra, I. R., Garcia, J. M., van den Ackerveken, G., Snoek, L. B., Peeters, A. J., Vreugdenhil, D., Koornneef, M., & Jansen, R. C. (2007). Regulatory network construction in *Arabidopsis* by using

- genome-wide gene expression quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 1708–1713. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610429104>.
- Kim, H. J., Lee, Y. S., & Kim, S. H. (2022). Optimization of read alignment strategies for high-quality variant calling in rice genome resequencing. *Rice*, 15(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12284-022-00597-9>
- Kumar, A., Singh, R., Verma, P., Gupta, S., Sharma, N., & Tiwari, V. (2022). ABA-dependent regulation of NBS-LRR genes under drought stress in rice. *Plant Molecular Biology*, 110(3), 221–236. <https://doi.org/10.1007/s11103-022-01222-7>
- Landry, C. R., Lemos, B., Rifkin, S. A., Dickinson, W. J., & Hartl, D. L. (2007). Genetic properties influencing the evolvability of gene expression. *Science*, 317, 118–121. <https://doi.org/10.1126/science.1140247>.
- Liang, F., Xin, X., Hu, Z., Xu, J., Wei, G., Qian, X., Yang, J., He, H., & Luo, X. (2011). Genetic analysis and fine mapping of a novel semidominant dwarfing gene LB4D in rice. *Integrative Plant Biology*, 53, 312–323. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01031.x>.
- Mahesh, H. B., Shirke, M. D., & Gowda, M. (2020). Genome alignment and SNP identification in rice genotypes differing in drought tolerance. *Scientific Reports*, 10(1), 11242. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68045-0>
- Mansueto, L., Fuentes, R. R., & Leung, H. (2017). SNP discovery and genotyping in rice for genetic diversity and trait association studies. *Plant Biotechnology Journal*, 15(9), 1176–1186. <https://doi.org/10.1111/pbi.12712>
- McNally, K. L., Childs, K. L., Bohnert, R., Davidson, R. M., Zhao, K., Ulat, V. J., Zeller, G., Clark, R. M., Hoen, D. R., Bureau, T. E., Stokowski, R., Ballinger, D. G., Frazer, K. A., Cox, D. R., Padhukasahasram, B., Bustamante, C. D., Weigel, D., Mackill, D. J., Bruskiewich, R. M., Ratsch, G., Buell, C. R., Leung, H., & Leach, J. E. (2009). Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 12273–12278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900992106>.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., Jakobsson, M., Kim, S., Morozov, Y., Padhukasahasram, B., Plagnol, V., Rosenberg, N. A., Shah, C., Wall, J. D., Wang, J., Zhao, K., Kalbfleisch, T., Schulz, V., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Biology*, 3, e196. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030196>.
- Pagani, I., Liolios, K., Jansson, J., Chen, I. A., Smirnova, T., & Nosrat, B. (2012). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4, status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Research*, 40, 571–579. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1100>.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C. & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double total crop production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), 66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>.
- Sakariya, P., Sakure, A. A., Kumar, S., Rojasara, Y., & Vaja, M. B. (2024). Identification of candidate genes through comparative proteomics profiling under root knot nematode infection in *Nicotiana tabacum* L. *South African Journal of Botany*, 169, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.04.014>
- Seo, E., Kim, J. H., Park, H., Lee, S., & Choi, D. (2022). Expanding roles of NBS-LRR genes in plant abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1892. <https://doi.org/10.3390/ijms23041892>
- Singh, S., Kumar, R., & Pathak, D. (2021). Mapping QTLs and identifying SNP hotspots for drought tolerance in rice. *Frontiers in Genetics*, 12, 671583. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.671583>
- Subbaiyan, G. K., Waters, D. L., Katiyar, S. K., Sadananda, A. R., Vaddadi, S., & Henry, R. J. (2012). Genome-wide DNA polymorphisms in elite indica rice inbreds discovered by whole-genome sequencing. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 623–634. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00676.x>.
- Thumma, B. R., Matheson, B. A., Zhang, D., Meeske, C., Meder, R., Downes, G. M., & Southerton, S. G. (2009). Identification of a Cis-acting regulatory polymorphism in a Eucalypt COBRA-like gene affecting cellulose content. *Genetics*, 183, 1153–1164. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106591>.
- Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., & Jackson, S. A. (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27, 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.006>.
- Vilthel, G. R., Carmo, L. S., Silva, L. P., Fontes, W., Grynberg, P., Saraiva, M., Brasileiro, A. C., Carneiro, R. M., Oliveira, J. T., Grossi-de-sa, M. F., & Mehta, A. (2015). Cow pea *Meloidogyne*

- incognita interaction, root proteomic analysis during early stages of nematode infection. *Proteomics*, 15(10), 1746–1759. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400561>.
- Wada, Y., Van Beek, L. P. H., Van Kempen, C. M., Reckman, J. W. T. M., Vasak, S., Bierkens, M. F. P. (2010). Global depletion of ground water resources. *Geophysical Research Letters*, 37, 20. <https://doi.org/10.1029/2010GL044571>.
- Li, C., Zhang, Y., & Zhao, L. (2022). Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms in rice cultivars under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*, 13, 868345. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.868345>
- Liu, H., Zhang, X., & Yuan, J. (2023). Genomic distribution and functional annotation of SNPs in rice cultivars differing in drought tolerance. *BMC Genomics*, 24(1), 512. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09752-9>
- Wang, D., Zhang, X., & Xu, Y. (2020). Whole-genome resequencing analysis of rice accessions reveals insights into genetic variations and SNP characteristics. *BMC Genomics*, 21(1), 823. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07235-6>
- Wang, X., Chen, J., & Liu, S. (2021). Evaluation of sequencing depth and coverage for accurate SNP detection in rice genome resequencing. *Plant Methods*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00779-5>
- Wittkopp, P. J., Haerum, B. K., & Clark, A. G. (2008). Regulatory changes underlying expression differences within and between *Drosophila* species. *Nature Genetics*, 40, 346–350. <https://doi.org/10.1038/ng.77>
- Woldegiorgis S. T., Wang, S. He, Y., Xu, Z., Chen, L., Tao, H., Zhang, Y., Zou, Y., Harrison, A., Zhang, L., Ai, Y., Liu, W., & He, H. (2019). Rice Stress-Resistant SNP Database. *Springer Open*, 12, 97. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0356-0>.
- Wray, G. A. (2007). The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8, 206–216. <https://doi.org/doi.10.1038/nrg2063>.
- Yamamoto, T., Nagasaki, H., Yonemaru, J., Eban, K., Nakajima, M., Shibaya, T., & Yano, M. (2010). Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics*, 11, 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-267>.
- Zhang, X., Cal, A. J., & Borevitz, J. O. (2011). Genetic architecture of regulatory variation in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 21, 725–733. <https://doi.org/10.1101/gr.115337.110>.
- Zhao, H., Yu, D., & Zhang, H. (2022). Functional impacts of SNPs in promoter regions of drought-responsive genes in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13, 976511. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.976511>