



Optimizing a MicroRNA Biosensor for the Detection of Spot Blotch Disease in Barley Plants

Nooshin Derakhshan¹ | Kamran Rahnama² | Keyvan Asefpour Vakilian³

1. Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: nooshinderakhshan2014@gmail.com

2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: rahnama@gau.ac.ir

3. Department of Biosystems Engineering, Faculty of Water and Soil Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: keyvan.asefpour@gau.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: March. 4, 2026

Revised: June. 6, 2026

Accepted: June. 21, 2026

Published online: Autumn 2026

Keywords:

*Biotic stress,
Electrochemical sensor,
MicroRNAs,
Support vector machine*

ABSTRACT

Although microRNAs are considered key regulators of plant responses to biotic stresses, their accurate measurement is challenging due to their extremely low concentrations. The aim of this study was to develop and optimize a microRNA-based electrochemical biosensor and to evaluate its performance in detecting biotic stress caused by spot blotch disease in barley plants. An electrochemical biosensor was designed based on the hybridization of the target microRNA with an oligonucleotide probe immobilized on a gold electrode surface, followed by the adsorption of positively charged silver-polyethyleneimine nanoparticles. Support vector machine regression was employed to optimize the probe volume and nanoparticle mass. The experimental dataset consisted of 100 observations, and five-fold cross-validation was used to evaluate model performance. After confirming the satisfactory performance of the model in predicting the electrochemical response of the biosensor (mean squared error of 0.004 and coefficient of determination of 0.97), the optimal probe volume and nanoparticle mass were determined by the developed model to be 9.15 mL and 1.85 µg, respectively. The calibration curve of the optimized biosensor exhibited a linear range from 10^{-19} to 10^{-11} M, and the biosensor was used to measure the concentrations of miRNA168 and miRNA397, which play essential roles in plant responses to spot blotch fungal disease. The biosensor data indicated a significant difference in the concentrations of these microRNAs between healthy and infected plants, confirming its effectiveness for early disease detection. Overall, the results demonstrate the considerable potential of the proposed biosensor for accurate identification of biotic stresses in plants.

Cite this article: Derakhshan, N., Rahnama, K., Asefpour Vakilian, K., (2026) Optimizing a MicroRNA Biosensor for the Detection of Spot Blotch Disease in Barley Plants, *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 57 (3), 55-69. <https://doi.org/10.22059/ijbse.2026.412146.665641>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2026.412146.665641>



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

microRNAs are a class of small non-coding RNA molecules that play a central role in post-transcriptional gene regulation and are critically involved in plant growth, development, and responses to biotic and abiotic stresses. Under biotic stress conditions such as pathogen infection, miRNAs rapidly respond by fine-tuning the expression of defense-related genes, making them promising molecular indicators for early stress detection in plants. However, the extremely low endogenous concentration of plant miRNAs, often in the femtomolar or attomolar range, poses major challenges for their reliable quantification using conventional techniques such as qPCR, microarrays, or northern blotting. In recent years, electrochemical biosensors have emerged as powerful analytical tools for sensitive miRNA detection due to their simplicity, high sensitivity, and potential for miniaturization. Nevertheless, the performance of such biosensors strongly depends on the optimal configuration of key design parameters, including probe density and nanomaterial loading. Therefore, this study aimed to develop and optimize an electrochemical miRNA biosensor using a machine learning-based approach and to evaluate its applicability for detecting brown spot disease-induced biotic stress in barley plants through quantification of miRNA168 and miRNA397.

Material and methods

An electrochemical microRNA biosensor was constructed based on the hybridization of target microRNAs with thiolated complementary oligonucleotide probes immobilized on a gold working electrode. Following hybridization, positively charged polyethyleneimine-silver nanoparticles (PEI-Ag NPs) were electrostatically attracted to the negatively charged probe-microRNA duplex, generating an electrochemical signal proportional to the target microRNA concentration. Cyclic voltammetry measurements were performed using a three-electrode system. To optimize biosensor performance, two key parameters—the probe volume (5–10 μL) and the mass of PEI-Ag NPs (1–6 μg)—were varied, resulting in a dataset of 100 experimental observations obtained at a target microRNA concentration of 1 fM. A support vector regression model with a radial basis function kernel was developed to model the nonlinear relationship between input variables and the biosensor response. Model hyperparameters were optimized using a genetic algorithm, and five-fold cross-validation was applied to assess predictive performance and prevent overfitting. After model validation, a dense input grid was generated to identify the global optimum configuration. The optimized biosensor was then calibrated using various dilutions of standard microRNA. Barley plants (*Hordeum vulgare* L., susceptible cultivar ‘Sahra’) were grown under controlled greenhouse conditions and inoculated with the spot blotch pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Fourteen days after inoculation, total RNA was extracted from leaf tissues, and microRNA concentrations were measured using the optimized biosensor.

Results and discussion

The support vector regression model demonstrated excellent predictive accuracy, with a mean squared error of 0.004 and a coefficient of determination (R^2) of 0.97 across cross-validation folds, indicating strong generalization capability. The optimal biosensor configuration was identified at a probe volume of 9.15 μL and a PEI-Ag NP mass of 1.85 μg , neither of which lay at the boundaries of the tested ranges, confirming the adequacy of the experimental design space. The optimized biosensor exhibited a wide linear detection range from 10^{-19} to 10^{-11} M, along with good repeatability. Application of the biosensor to plant samples revealed significant alterations in miRNA168 and miRNA397 concentrations in infected barley leaves compared with healthy controls. The observed increase in miRNA168 is consistent with its regulatory role in targeting *AGO1*, suggesting a feedback mechanism to balance RNA silencing activity during immune activation. Similarly, elevated miRNA397 levels imply modulation of laccase-mediated lignification pathways, potentially favoring the accumulation of antimicrobial phenolic compounds during early infection stages. These findings demonstrate that the developed biosensor is capable of capturing biologically meaningful microRNA expression changes associated with pathogen-induced stress.

Conclusion

This study presents a machine learning-assisted strategy for optimizing an electrochemical microRNA biosensor and demonstrates its successful application for detecting biotic stress in barley plants. The integration of support vector regression with experimental biosensor data enabled accurate modeling and efficient identification of optimal design parameters, resulting in high sensitivity and a broad linear detection range. The optimized biosensor effectively discriminated between healthy and diseased plants based on miRNA expression profiles, highlighting its potential as a rapid and sensitive tool for early plant stress diagnostics. Although environmental variability and the multifactorial regulation of miRNA expression remain challenges

for large-scale field deployment, the proposed approach provides a strong foundation for developing advanced biosensing platforms for precision agriculture and plant health monitoring.

Funding

The study was funded by the Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources under the title of Approved Grants for PhD Dissertations.

Authorship contribution

K.R. and K.A.: Conceptualization; N.D.: Methodology; N.D. and K.A.: Formal analysis; N.D.: Writing—original draft preparation; K.R. and K.A.: Writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability statement

Data is available upon reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources for funding.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

بهینه‌سازی یک زیست‌حسگر microRNA برای شناسایی بیماری لکه قهوه‌ای گیاه جو

نوشتن درخشان^۱ | کامران رهنما^۲ | کیوان آصف‌پور وکیلان^۳

۱. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:

nooshinderakhshan2014@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:

rahnama@gau.ac.ir

۳. گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده مهندسی آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه:

keyvan.asefpour@gau.ac.ir

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۱۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۳/۳۱

تاریخ انتشار: پاییز ۱۴۰۵

واژه‌های کلیدی:

ترکیبات microRNA

تنش زیستی،

حسگر الکتروشیمیایی،

ماشین بردار پشتیبان.

اگرچه ترکیبات microRNA از تنظیم‌کننده‌های کلیدی پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی به شمار می‌آیند، اما اندازه‌گیری دقیق آن‌ها به دلیل غلظت بسیار پایین، چالش‌برانگیز است. هدف از این پژوهش، توسعه و بهینه‌سازی یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر microRNA و ارزیابی کارایی آن در شناسایی تنش زیستی ناشی از بیماری لکه قهوه‌ای در گیاه جو بود. بدین منظور، یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی بر پایه هیبریداسیون microRNA هدف با پراب الیگونوکلوئیدی تثبیت‌شده بر سطح الکتروود طلا و جذب نانوذرات نقره-پلی‌اتیلن‌ایمین با بار مثبت طراحی شد. برای بهینه‌سازی حجم پراب و جرم نانوذرات، از رگرسیون ماشین بردار پشتیبان استفاده شد. داده‌های آزمایشی شامل ۱۰۰ مشاهده بوده و اعتبارسنجی متقابل پنج‌تایی برای ارزیابی عملکرد مدل به کار رفت. پس از حصول اطمینان از عملکرد مطلوب مدل در پیش‌بینی پاسخ الکتروشیمیایی زیست‌حسگر (میانگین مربعات خطا ۰/۰۰۴ و ضریب تبیین ۰/۹۷)، مقادیر بهینه حجم پراب و جرم نانوذرات به ترتیب ۹/۱۵ میلی‌لیتر و ۱/۸۵ میکروگرم توسط مدل توسعه‌یافته تعیین شد. نمودار واسنجی زیست‌حسگر بهینه‌شده نشان‌دهنده محدوده خطی 10^{-11} تا 10^{-10} مولار بود و از زیست‌حسگر به دست آمده برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات miRNA168 و miRNA397 که نقش اساسی در پاسخ گیاه در برابر بیماری قارچی لکه قهوه‌ای دارند، بهره گرفته شد. داده‌های زیست‌حسگر حاکی از اختلاف قابل توجه غلظت این ترکیبات بین گیاه سالم و گیاه آلوده بودند که عملکرد آن را به عنوان یک روش مناسب برای شناسایی ظهور بیماری اثبات کرد. نتایج این پژوهش بیانگر پتانسیل قابل توجه زیست‌حسگر پیشنهادی برای شناسایی دقیق تنش‌های زیستی در گیاهان است.

استناد: درخشان؛ نوشتن، رهنما؛ کامران، آصف‌پور وکیلان؛ کیوان، (۱۴۰۵) بهینه‌سازی یک زیست‌حسگر microRNA برای شناسایی بیماری لکه قهوه‌ای گیاه جو،

<https://doi.org/10.22059/ijbse.2026.412146.665641> مجله مهندسی بیوسیستم ایران/ ایران، ۵۷ (۳)، ۵۵-۶۹.

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2026.412146.665641>

مقدمه

ترکیبات microRNA که به‌عنوان گروهی از مولکول‌های RNA غیرکدکننده با طول معمول ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید شناخته می‌شوند، تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیان ژن در گیاهان به شمار می‌آیند (Ding et al., 2024). مشارکت ترکیبات microRNA در پاسخ‌های زیستی و تنش‌های غیرزیستی گیاهان، بخشی از مسیرهای اصلی تنظیم ژن و پروتئین را تشکیل می‌دهد. پژوهش‌های اخیر به‌طور گسترده به بررسی کارکردهای زیستی ترکیبات microRNA در گیاهان پرداخته‌اند و نقش‌های حیاتی آن‌ها را به‌ویژه در سازوکارهای پاسخ به تنش برجسته ساخته‌اند (Wang et al., 2023). این مولکول‌ها طیف وسیعی از فرایندهای زیستی، از جمله رشد، نمو، سیگنال‌دهی هورمونی و سازگاری با تنش‌های زیستی و غیرزیستی را به‌صورت هماهنگ تنظیم می‌کنند (Ding et al., 2024; Samadi et al., 2025).

گیاهان از طریق سازوکارهای متعددی با میکروارگانیسم‌ها تعامل دارند که این تعاملات شامل روابط همزیستی سودمند و همچنین راهبردهای دفاعی پیچیده در برابر تهاجم بیمارگرها است (Luo et al., 2024). این راهبردهای دفاعی شامل موانع فیزیکی، دفاع‌های بیوشیمیایی، شناسایی و انتقال سیگنال، و مقاومت اکتسابی سیستمیک هستند. ترکیبات microRNA نقش محوری در تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی گیاه ایفا می‌کنند و با تعدیل رونویسی ژن‌های خاصی که مستقیماً در مکانیسم‌های دفاعی گیاه علیه عوامل بیمارگر دخیل هستند، عمل می‌کنند (Luo et al., 2024). هم‌زمان، گیاهان از ترکیبات microRNA به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پسارونویسی بسیار مهم و وابسته به توالی برای کنترل بیان ژن بهره می‌گیرند تا بتوانند در طول چرخه رشد و نمو خود با تنش‌های غیرزیستی متعدد سازگار شوند (Pervaiz et al., 2022).

در سال‌های اخیر، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در شرایط تنش زیستی، از جمله آلودگی‌های قارچی، حملات باکتریایی، هجوم آفات و شیوع بیماری‌ها، ترکیبات microRNA واکنش‌پذیری سریعی از خود نشان می‌دهند و از طریق تنظیم دقیق بیان ژن‌های هدف، در سازوکارهای دفاعی گیاه مشارکت می‌کنند (Pan et al., 2025). مطالعات نوظهور، شبکه‌های تنظیمی میانجی‌گری‌شده توسط ترکیبات microRNA را به‌عنوان عناصر کلیدی در برهم‌کنش‌های گیاه-بیمارگر معرفی کرده‌اند. بیماری لکه قهوه‌ای از جمله بیماری‌های برگ‌ی مخرب در گیاهان گندم و جو است که توسط قارچ *Bipolaris sorokiniana* ایجاد می‌شود (Basak et al., 2024). این بیماری علاوه بر گندم و جو در بسیاری از گونه‌های گندمیان و چند گونه از دولپه‌ای‌ها خسارت‌زا است (Ghazvini, 2018). مطابق گزارش‌های موجود، نشانه‌های بیماری لکه قهوه‌ای در بیش از ۹۰ کشور در تمام دنیا مشاهده شده است (Ghazvini, 2018). در ایران نیز حضور این بیماری در استان‌های خراسان، گلستان، مازندران، آذربایجان شرقی و غربی، کرمانشاه، مرکزی و لرستان گزارش شده است (Dokhanchi et al., 2022). پژوهش‌های متعددی روی گندمیان نشان داده‌اند که در مرکز تنظیم پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، ترکیبات miRNA168 و miRNA397 قرار دارند که از طریق ژن‌های هدف *AGO1* و *laccase* نحوه دفاع گیاه را تنظیم می‌کنند (Volná et al., 2022).

اگرچه روش‌های مختلفی مانند ریزآرایه‌ها^۱ (Yin et al., 2008)، بلائینگ شمالی^۲ (Várallyay et al., 2008)، و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳ (PCR) (Marabita et al., 2016) به‌طور متداول برای اندازه‌گیری بیان ترکیبات microRNA موجود در گیاهان به کار رفته است، این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند کمترین حد تشخیص نامطلوب، محدوده خطی کوچک و حساسیت کم هستند (Mourya et al., 2012; Turner, 2013). در این شرایط، اگر سطح تنش کوچک باشد و منجر به تغییرات وسیع بیان ترکیبات microRNA نشوند، ممکن است این روش‌ها نتایج مطلوبی در بررسی و شناسایی تنش ارائه نکنند. در عوض، حسگرهایی که دارای گیرنده زیستی زنده هستند و زیست‌حسگر نامیده می‌شوند، به‌عنوان یک روش قابل اعتماد برای تشخیص دقیق و حساس غلظت ترکیبات microRNA توسعه یافته‌اند (Johnson and Mutharasan, 2014). امروزه، زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی که از تجمع نانوذرات با بار الکتریکی مثبت در مجاورت الکترودهای حاوی ترکیب هیبرید شده اولیگونوکلوئوتید/ترکیب microRNA هدف با بار الکتریکی منفی بهره می‌برند، با ویژگی‌های کارکردی قابل قبول و محدوده خطی گسترده برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در سطوح اتمی و فمتومولار معرفی شده‌اند (Tran and Piro, 2021; Dorosti et al., 2022). اما این روش‌ها عموماً به بهینه‌سازی غلظت نانومواد و همچنین ترکیبات اولیگونوکلوئوتیدی مورد استفاده در ساختار زیست‌حسگر نیاز دارند تا بتوانند حداکثر حساسیت را در اندازه‌گیری ترکیب microRNA

1. Microarrays
2. Northern blotting
3. Polymerase chain reaction

هدف ارائه دهند.

بررسی پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد از زیست‌حسگرها برای شناسایی تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاهان بهره گرفته شده است. یک مقاله مروری به تازگی (زیست) حسگرهای الکتروشیمیایی توسعه‌یافته برای پایش مواد شیمیایی کشاورزی، هورمون‌های گیاهی، بهبوددهنده‌های رشد و تنش زیستی و غیر زیستی در گیاهان را مورد بررسی قرار داده است (Seddaoui and Arduini, 2025). از آنجا که بیان برخی آنزیم‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره شرایط تنش در گیاهان فراهم کند (Aina et al., 2024)، محققان زیست‌حسگرهای متعددی برای اندازه‌گیری این آنزیم‌ها معرفی کرده‌اند. برای مثال، یک ریزتراشه سه‌الکترودی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم β -گلوکورونیداز ارائه شده است که با استفاده از پلی‌دی‌متیل سیلوکسان روی برگ گیاه نصب می‌شود. در شرایط تنش گرمایی، فعالیت آنزیم افزایش یافته و محصول واکنش تولیدشده پس از خروج از سلول‌های گیاهی روی الکترود کاری اکسید و در نتیجه، موجب افزایش قابل توجه سیگنال جریان در زیست‌حسگر می‌شود. کمترین حد تشخیص برای این زیست‌حسگر ۱۰۰ میکرومولار گزارش شد (Pandey et al., 2018). در پژوهش دیگری، یک زیست‌حسگر سوزنی توخالی با قطر دهانه ۳۰۰ میکرومتر برای پایش گلوکز در گیاهان به عنوان یک نشانگر تنش توسعه داده شد که ضمن نفوذ به کوتیکول گیاه، کمترین آسیب را ایجاد می‌کرد. این سامانه از الکترودهای مرجع و کمکی به همراه یک الکترود کاری پلاتین اصلاح‌شده با نانوذرات طلا، نافیون، آنزیم گلوکز اکسیداز و پلی‌اورتان تشکیل شده بود. نتایج نشان دادند که این زیست‌حسگر قادر به اندازه‌گیری گلوکز در محدوده ۱۰۰ میکرومولار تا ۱۰۰ میلی‌مولار با کمترین حد تشخیص ۳۳/۳ میکرومولار بود. از این زیست‌حسگر برای تشخیص تنش شوری در گوجه‌فرنگی استفاده شد (Chen et al., 2024).

در سال‌های اخیر، ماشین بردار پشتیبان به عنوان یکی از روش‌های کارآمد یادگیری ماشین، جایگاه ویژه‌ای در مدل‌سازی، پیش‌بینی و بهینه‌سازی مسائل مهندسی پیدا کرده است. در مسائل بهینه‌سازی مبتنی بر داده، ماشین بردار پشتیبان و به‌ویژه در قالب رگرسیون بردار پشتیبان برای تقریب رابطه بین ورودی‌ها و خروجی سامانه‌ها به کار می‌رود (Samadi et al., 2025). در این رویکرد، ابتدا داده‌های آموزشی شامل متغیرهای ورودی و خروجی متناظر به مدل آموزش داده می‌شوند. سپس مدل آموزش‌دیده قادر است برای نقاط درونیابی‌شده در فضای ورودی، مقدار خروجی را با دقت بالا پیش‌بینی و بدین ترتیب یک «سطح پاسخ» غیرخطی از سامانه واقعی ایجاد کند. این سطح پاسخ می‌تواند مبنای جست‌وجوی نقطه یا ناحیه بهینه ورودی‌ها قرار گیرد. مزیت اصلی ماشین بردار پشتیبان در بهینه‌سازی، توانایی بالای آن در مدل‌سازی روابط غیرخطی پیچیده با تعداد داده محدود و مقاومت مناسب در برابر بیش‌برازش است. استفاده از توابع کرنل مانند تابع پایه شعاعی این امکان را فراهم می‌کند که بدون تعریف صریح ساختار مدل، رفتار سیستم در فضاهای با ابعاد بالاتر بازنمایی شود (Asefpour Vakilian, 2025). در مقابل، روش آنالیز سطح پاسخ (RSM) یک رویکرد کلاسیک آماری است که معمولاً بر پایه توابع چندجمله‌ای مرتبه دوم بنا شده است (Veza et al., 2023). اگرچه روش آنالیز سطح پاسخ برای طراحی آزمایش، تحلیل اثر متغیرها و بهینه‌سازی محلی بسیار کارآمد است، اما فرض ضمنی آن ساده‌بودن شکل سطح پاسخ است. در نتیجه، در مواجهه با رفتارهای شدیداً غیرخطی یا ناپیوسته، دقت آن کاهش می‌یابد (Zhou et al., 2026).

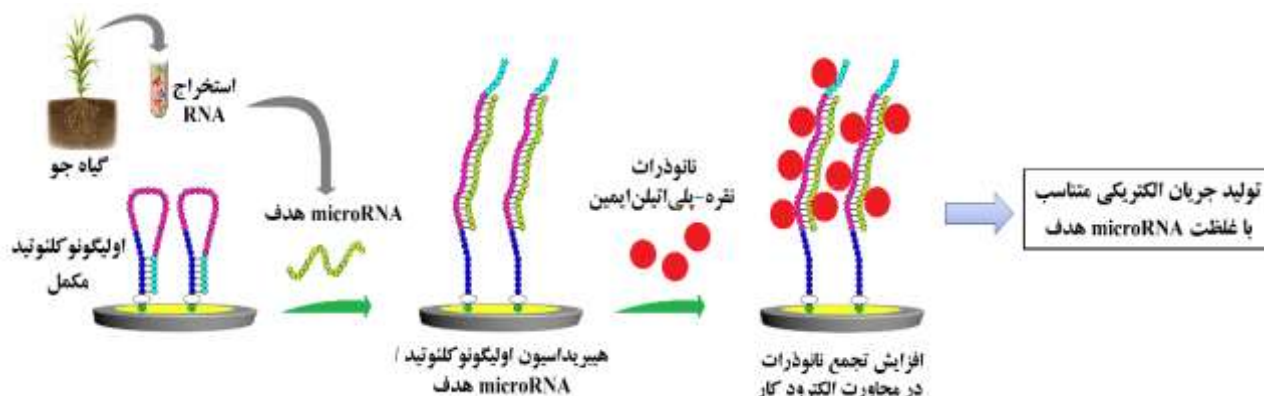
پژوهش حاضر به دنبال دستیابی به یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی با ساختار بهینه‌شده است که بتواند برای شناسایی تنش‌های زیستی در گیاهان مناسب باشد. به همین منظور، از ماشین بردار پشتیبان برای بهینه‌سازی غلظت‌های ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در زیست‌حسگر بهره گرفته شد و عملکرد زیست‌حسگر بهینه‌شده برای شناسایی بیماری لکه قهوه‌ای در گیاه جو بررسی شد. از این رو، اهداف این مطالعه شامل موارد زیر بودند: (الف) توسعه یک مدل مبتنی بر ماشین بردار پشتیبان برای بهینه‌سازی غلظت نانومواد و ترکیبات اولیگونوکلوئیدی مورد استفاده در ساختار زیست‌حسگر الکتروشیمیایی microRNA؛ و (ب) ارزیابی زیست‌حسگر بهینه برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات miRNA168 و miRNA397 در گیاه جو که در اثر بیماری لکه قهوه‌ای تغییر می‌کند.

مواد و روش‌ها

توسعه زیست‌حسگر الکتروشیمیایی microRNA

در این پژوهش، روش ارائه‌شده توسط حکیمیان و قورچیان (Hakimian and Ghourchian, 2020) برای توسعه زیست‌حسگر الکتروشیمیایی و اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در نمونه‌های گیاه جو مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس این روش، هنگامی که ترکیبات microRNA موجود در نمونه‌ها با توالی‌های الیگونوکلوئیدی مکمل تثبیت‌شده روی سطح الکترود هیبرید می‌شوند، بار منفی در نزدیکی سطح الکترود افزایش می‌یابد. این موضوع باعث می‌شود نانوذرات پلی‌اتیلن‌ایمین نقره (PEI-Ag) با بار مثبت به عنوان

برچسب‌های الکترواکتیو روی ترکیب هیبرید شده microRNA / الیگونوکلوئوتید جذب شوند که باعث تولید جریان الکتریکی متناسب با غلظت microRNA هدف می‌شود (شکل ۱). از زیست‌حسگر الکتروشیمیایی موجود در آزمایشگاه گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که دارای الکتروود کار از جنس طلا بود استفاده شد.



شکل ۱. شماتیک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA

توالی اولیگونوکلوئوتیدی مکمل ترکیبات miRNA168 و miRNA397 (به شکل تیوله به عنوان پراب) به همراه نمونه استاندارد miRNA168 از شرکت بازرگانی نوین‌زیست‌فناوران پیروز خریداری شد. برای تهیه نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین، ۲۵ میلی‌لیتر نیترات نقره با غلظت ۹ میلی‌مولار و ۵ میلی‌لیتر پلی اتیلن ایمین در حال هم زدن به دمای جوش رسانده شدند. پس از ۱۵ دقیقه، رنگ محلول از بی‌رنگ به سبز تبدیل شد. پس از سانتریفیوژ محلول، رسوب آن با استفاده از دستگاه هموژنایزر فراصوت به مدت یک دقیقه با آب دیونیزه شسته شد. پراب‌های تهیه شده به دلیل وجود گروه گوگردی به راحتی روی الکتروود طلای زیست‌حسگر تثبیت شدند. به این منظور، حجم مشخصی از پراب (۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر با فاصله‌های ۰/۵ میلی‌لیتر) با غلظت ۱ میلی‌مولار و ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با یکدیگر مخلوط و روی الکتروود ریخته شدند. سپس الکتروود زیر نور مادون قرمز به مدت ۳۰ دقیقه خشک و ۳ بار با آب دیونیزه شسته شد. در مرحله بعد، الکتروود طلا در محلول متشکل از بافر فسفات با غلظت ۱ مولار در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور و بلافاصله پس از آن، ۲ میکرولیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط و روی سطح الکتروود ریخته شد. سپس، الکتروود زیر لامپ مادون قرمز خشک و با آب دیونیزه شسته و برای اندازه‌گیری‌ها استفاده شد.

در ادامه، نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین با بار مثبت (با جرم مشخص از ۱ تا ۶ میکروگرم با فاصله‌های ۰/۵ میکروگرم در ۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه) روی سطح الکتروود ریخته شد تا روی ترکیب هیبرید شده پراب نمونه که بار منفی دارد، جذب شوند. پس از خشک شدن مخلوط روی الکتروود، الکتروود در داخل محلول بافر حاوی نمونه استاندارد miRNA168 با غلظت ۱ فمتومولار قرار داده شد. منحنی ولتاژتیتری چرخه‌ای به کمک سامانه سه الکترودی با روبش در ناحیه ۶۰۰- تا ۶۰۰ میلی‌ولت و سرعت روبش ۱۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه به دست آمد.

رویکرد مبتنی بر ماشین بردار پشتیبان برای بهینه‌سازی زیست‌حسگر

همان‌گونه که در بخش پیشین ذکر شد، در طول آزمایش‌ها، حجم مشخصی از پراب (در ۱۰ سطح، از ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر با فاصله‌های ۰/۵ میلی‌لیتر) و جرم مشخصی از نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین (در ۱۰ سطح، از ۱ تا ۶ میکروگرم با فاصله‌های ۰/۵ میکروگرم) در ساختار زیست‌حسگر مورد بررسی قرار گرفت و پاسخ زیست‌حسگر به ازای غلظت ۱ فمتومولار اندازه‌گیری و ثبت شد. در نتیجه، یک پایگاه داده با ۱۰۰ مشاهده به دست آمد.

از یک رویکرد مبتنی بر ماشین بردار پشتیبان برای بهینه‌سازی حجم پراب و جرم نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین استفاده شد. مدل شامل دو ورودی (حجم پراب و جرم نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین)، و یک خروجی (پاسخ الکتروشیمیایی زیست‌حسگر بر حسب میکروآمپر) بود. از کرنل تابع پایه شعاعی استفاده شد. برای بهبود عملکرد مدل، آبرپارامترهای مدل شامل پارامتر کرنل و پارامتر هزینه به کمک الگوریتم ژنتیک بهینه شدند. برای اطمینان از جستجوی کامل فضای پاسخ در الگوریتم ژنتیک، اندازه جمعیت اولیه ۵۰، حداکثر تعداد

نسل‌ها ۱۰۰، نرخ ترکیب ۵۰ درصد و نرخ جهش ۱۰ درصد تنظیم شدند. تابع برازندگی^۱ در این الگوریتم، کمینه‌سازی میانگین مربعات خطای مدل در پیش‌بینی پاسخ الکتروشیمیایی زیست‌حسگر تعریف شد. مدل ترکیبی ماشین بردار پشتیبان و الگوریتم ژنتیک در محیط برنامه‌نویسی MATLAB (R2018b, Mathworks, USA) توسعه داده شد.

برای ارزیابی عملکرد مدل و بررسی وقوع یا عدم وقوع بیش‌برازش، از روش اعتبارسنجی متقابل ۵ تایی استفاده شد. در این روش، ابتدا داده‌ها بین صفر و یک نرمالیزه شد (Mahdavi et al., 2025). داده‌های پایگاه داده به پنج بخش تقسیم شدند و فرآیند آموزش و آزمون شبکه پنج بار تکرار شد. در هر تکرار، یک بخش به عنوان داده‌های آزمون قرار گرفت و سایر بخش‌ها برای آموزش استفاده شدند، به‌گونه‌ای که تمامی داده‌ها حداقل یک بار به عنوان داده‌های آزمون ارزیابی شدند. ارزیابی عملکرد مدل بر مبنای میانگین مربعات خطا (MSE) (رابطه ۱) و ضریب تبیین (R^2) (رابطه ۲) انجام شد

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_p - x_o)^2 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (x_p - x_o)^2}{\sum_{i=1}^n (x_o - \bar{x}_o)^2} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

که در این روابط، x_o مقدار مشاهداتی است که باید توسط ماشین پیش‌بینی شود، x_p مقدار پیش‌بینی شده توسط ماشین است، و n تعداد کل نمونه‌ها است. از آنجا که از روش اعتبارسنجی عرضی پنج‌تایی برای آموزش و آزمون ماشین‌ها استفاده شد، پنج عدد میانگین مربعات خطا و پنج ضریب تبیین برای ارزیابی عملکرد هر ماشین بهینه به دست آمد که برای مقایسه ماشین‌ها، میانگین این اعداد در این پژوهش گزارش گردید.

پس از ارزیابی عملکرد موفق ماشین، هر یک از بازه‌های حجم پراب (۵ تا ۲۵ میلی‌لیتر) و جرم نانوذرات (۱ تا ۳ میکروگرم) به ۱۰۰ قسمت با فاصله‌های برابر تقسیم و پاسخ الکتروشیمیایی به ازای هر حالت پیش‌بینی شد. در نتیجه، ۱۰۰۰۰ پیش‌بینی با ماشین بردار پشتیبان در یک ساختار تکرارشونده انجام شد و سطوح تغییرات پیش‌بینی شده پاسخ الکتروشیمیایی به منظور شناسایی مقادیر بهینه ورودی‌های مدل به دست آمد.

مواد گیاهی و شرایط رشد در گلخانه

کشت گیاهان در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. شرایط رشد گیاهان جو در گلخانه و مایه‌زنی بیمارگر لکه قهوه‌ای مطابق درخشان و همکاران (Derakhshan et al., 2026) انجام شد. در ابتدا، ۸ دانه جو (رقم حساس صحرا) در هر گلدان پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی‌متر که حاوی خاک کشاورزی سترون شده، کوکویت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ بود، کاشته شد. بافت خاک شنی لومی با pH برابر با ۷/۸، ماده آلی ۲/۵ درصد و ظرفیت مبادله کاتیونی برابر با ۱۲/۷ meq بر هر ۱۰۰ گرم بود. گلدان‌ها برای رشد در گلخانه با دمای 23 ± 2 درجه سلسیوس در طول روز و 12 ± 2 درجه سلسیوس در شب، دوره نوری مصنوعی ۱۴:۱۰ ساعت نور: تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفتند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، به هر تشتک حاوی کشت خالص قارچ بیمارگر لکه قهوه‌ای موجود در کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصل با استفاده از لام هموسیتمومتر با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. در مرحله ۳-۴ برگ گیاهچه‌ها، از سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ بیمارگر در چهار تکرار روی برگ گیاه جو استفاده شد و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، غلظت ترکیبات microRNA گیاهان به کمک زیست‌حسگر بهینه‌شده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA نمونه‌های گیاهی با زیست‌حسگر بهینه‌شده

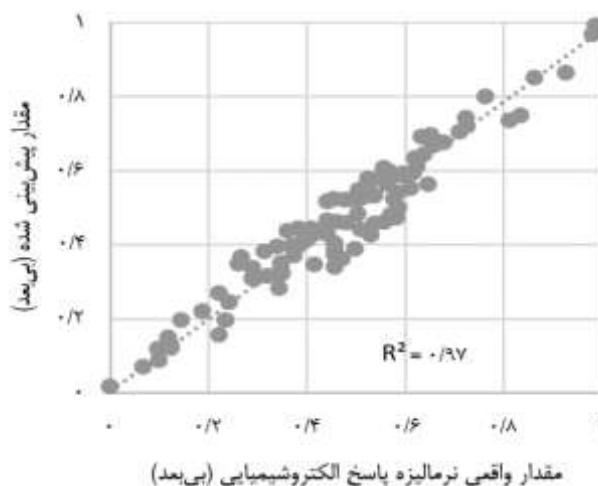
ابتدا RNA نمونه‌های برگ نگهداری شده در فریزر (-80°C درجه سلسیوس) با استفاده از کیت استخراج RNA به روش غیرستونی بر پایه تریزول و طبق پروتکل شرکت سازنده (دنازیست آسیا، تهران، ایران) استخراج شد. برای استخراج RNA، ابتدا نمونه خشک و پودر شده گیاهی با ۱ میلی‌لیتر از معرف تجاری تریزول به‌خوبی مخلوط شد. پس از همگن‌سازی در میکروتیوب، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به

آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با یخ نگهداری شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، دو فاز مجزا تشکیل شد که از فاز بالایی، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر جدا و با حجم مساوی ایزوپروپانول مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در یخ انکوبه شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته و رسوب RNA با افزودن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. نمونه بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در مجاورت جریان هوا خشک شد تا RNA کل استخراج شود. الکتروژن زیست‌حسگر بهینه در محلول بافر حاوی RNA استخراج شده قرار داده شد تا جریان الکتریکی اندازه‌گیری شود.

نتایج و بحث

سطوح بهینه حجم پراب و جرم نانوذرات در ساختار زیست‌حسگر

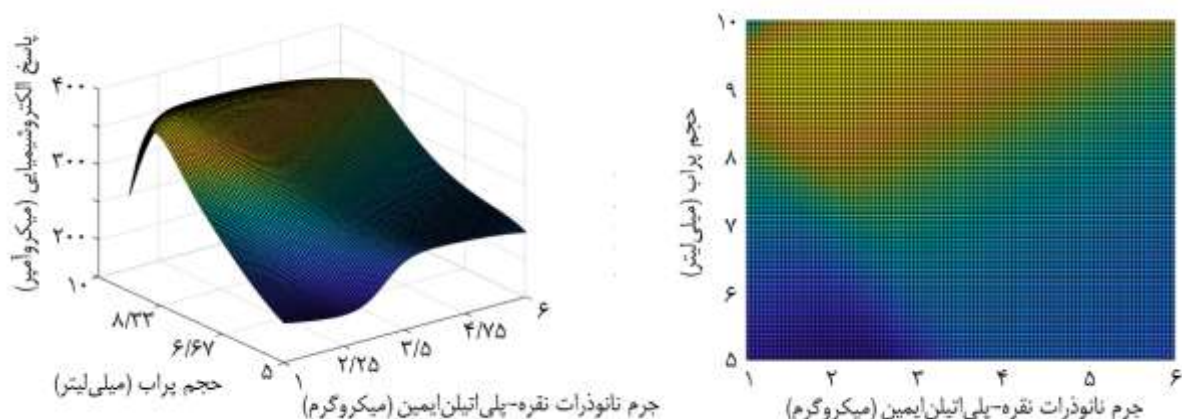
شکل ۲ نشان می‌دهد که مدل ماشین بردار پشتیبان توسعه داده شده در این پژوهش از عملکرد پیش‌بینی مطلوبی در چارچوب روش اعتبارسنجی متقابل ۵ تایی برخوردار است. توزیع مناسب داده‌های پیش‌بینی شده در اطراف خط ایده‌آل ($y = x$)، همراه با مقدار بسیار پایین میانگین مربعات خطا (۰/۰۰۴) و ضریب تبیین بالا (۰/۹۷)، بیانگر توان بالای مدل در یادگیری الگوهای حاکم بر داده‌ها و تعمیم‌پذیری مناسب آن است. این نتایج نشان می‌دهد که مدل ماشین بردار پشتیبان قادر است روابط غیرخطی پیچیده میان متغیرهای ورودی و خروجی را با دقت بالایی استخراج کند، به گونه‌ای که حتی برای سطوحی از ورودی‌ها که در طول آزمایش‌های تجربی به‌طور مستقیم مورد بررسی قرار نگرفته‌اند نیز پیش‌بینی‌های قابل اعتمادی ارائه می‌دهد. از این رو، می‌توان اطمینان داشت که مدل توسعه یافته از قابلیت تعمیم مناسبی برخوردار بوده و دچار بیش‌برازش نشده است. لازم به ذکر است از آنجا که مقادیر پاسخ الکتروشیمیایی زیست‌حسگر بین صفر و یک نرمالیزه شده بود، بازه تغییر داده‌ها در شکل ۲ نیز بین صفر و یک بود.



شکل ۲. عملکرد مدل ماشین بردار پشتیبان در پیش‌بینی داده‌های نرمالیزه پاسخ الکتروشیمیایی در روش اعتبارسنجی متقابل ۵ تایی

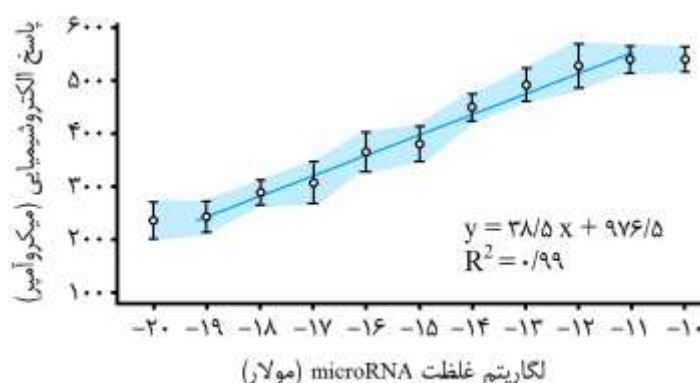
شکل ۳ پاسخ مدل یادگیری ماشین بردار پشتیبان را در غلظت ۱ فمومولار از ترکیب miRNA168 برای فرآیند بهینه‌سازی حجم پراب و جرم نانوذرات نقره-پلی‌اتیلن‌ایمین نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصل، مقادیر بهینه حجم پراب و جرم نانوذرات به ترتیب برابر با ۹/۱۵ میلی‌لیتر و ۱/۸۵ میکروگرم به دست آمد. نکته حائز اهمیت آن است که این مقادیر بهینه در مرزهای بازه تغییرات متغیرهای ورودی قرار نگرفته‌اند، که این موضوع نشان دهنده انتخاب مناسب دامنه تغییرات پارامترها در فرآیند بهینه‌سازی و همچنین توانایی مدل در شناسایی نقطه بهینه واقعی است. نتایج این تحقیق با یافته‌های پژوهش‌های پیشین هم‌راستا است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که مدل ماشین بردار پشتیبان به دلیل ساختار مبتنی بر بهینه‌سازی محدب، مقاومت در برابر نوفه، و کارایی بالا در مجموعه داده‌های کوچک و غیرخطی، یکی از گزینه‌های مناسب برای مدل‌سازی داده‌های تجربی و زیستی محسوب می‌شود (Balabin and Lomakina, 2011; Sharbati et al., 2025). عملکرد مطلوب مدل در این پژوهش، به‌ویژه دقت بالا و قابلیت تعمیم مناسب، تأییدکننده این ادعاست و نشان می‌دهد که

این روش می‌تواند ابزار قدرتمندی برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی پاسخ‌های الکتروشیمیایی زیست‌حسگرها باشد.



شکل ۳. کانتور دوبعدی و سطح پاسخ خروجی مدل یادگیری ماشین به ازای غلظت ۱ فمتومولار ترکیب microRNA168 برای بهینه‌سازی حجم پراب و جرم نانوذرات نقره-پلی اتیلن ایمین (میکروگرم)

پس از دستیابی به ساختار بهینه زیست‌حسگر، نمونه استاندارد microRNA در سطوح مشخصی رقیق شد تا منحنی واسنجی عملکرد زیست‌حسگر به دست آید. نمودار واسنجی زیست‌حسگر در شکل ۴ آورده شده است. اندازه‌گیری با ۵ تکرار انجام شد و ناحیه آبی روشن، پراکندگی داده‌های جریان الکتریکی نمونه‌های مورد مطالعه را از جریان پیک میانگین نشان می‌دهد که نشان‌دهنده تکرارپذیری قابل قبول زیست‌حسگر توسعه‌یافته است. مطابق این شکل، یک محدوده خطی از 10^{-19} تا 10^{-11} مولار (خط آبی تیره‌تر) برای عملکرد زیست‌حسگر به دست آمد. به منظور ارزیابی دقت زیست‌حسگر، آزمون بازیابی با افزودن مقادیر ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ فمتومولار از هر یک از ترکیبات microRNA هدف به نمونه انجام شد. مقادیر بازیابی در محدوده ۹۶ تا ۱۰۲ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده توانایی حسگر در اندازه‌گیری دقیق microRNA و خطای کم آن بود. در مورد اختصاصی بودن زیست‌حسگر، مطالعات قبلی روی زیست‌حسگرهای microRNA دخیل در سرطان انسان که بر اساس جذب نانوذرات با بار مثبت روی ترکیب هیبرید پراب-microRNA هدف با بار منفی کار می‌کنند، نشان داده‌اند که پاسخ چنین زیست‌حسگرهایی در حضور microRNA هدف چندین برابر بزرگتر از پاسخی است که با حضور microRNA عدم تطابق سه یا بیشتر جفت‌باز تولید می‌شود (Hakimian and Ghourchian, 2020). بازه خطی به دست آمده برای زیست‌حسگر می‌تواند برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در بسیاری از بافت‌های گیاهی سودمند باشد. بازه غلظتی ترکیبات microRNA در گیاهان به‌طور گسترده‌ای در مطالعات زیست‌مولکولی و فیزیولوژی گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج اغلب پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این مولکول‌های تنظیمی در غلظت‌های بسیار پایین بیان می‌شوند (Asefpour Vakilian, 2020a). این ترکیبات به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیان ژن، معمولاً در مقادیر ناچیز اما با اثرات زیستی قابل توجهه عمل می‌کنند. به همین دلیل، غلظت آن‌ها در بافت‌های گیاهی اغلب در بازه‌های فمتومولار و حتی آتومولار گزارش شده است (Crawford et al., 2019).



شکل ۴. نمودار کالیبراسیون حسگر زیستی. ناحیه آبی روشن، پراکندگی داده‌های جریان پیک میکرو RNA های مورد مطالعه را از جریان پیک میانگین نشان می‌دهد. خط آبی تیره‌تر، محدوده خطی را نشان می‌دهد.

سطح بسیار پایین غلظت را می‌توان به نقش تنظیمی دقیق این ترکیبات نسبت داد؛ به گونه‌ای که مقدار اندکی از این مولکول‌ها قادر است مسیرهای مولکولی متعددی را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، بیان ترکیبات microRNA به شدت وابسته به نوع بافت، مرحله رشد گیاه و شرایط تنش‌های محیطی نظیر تنش خشکی، شوری یا آلودگی‌های زیستی است (Mohammadi and Asefpour Vakilian, 2023). با این حال، حتی در شرایط القای بیان، غلظت این ترکیبات معمولاً از محدوده فمتومولار فراتر نمی‌رود. گزارش غلظت‌های فمتومولار و آتومولار برای ترکیبات microRNA گیاهی اهمیت ویژه‌ای در طراحی روش‌های آشکارسازی و زیست‌حسگرها دارد، زیرا نشان می‌دهد که ابزارهای تجزیه‌ای مورد استفاده باید از حساسیت بسیار بالایی برخوردار باشند (Kawakatsu et al., 2025). اجماع موجود در تحقیقات گذشته بیانگر آن است که بازه غلظتی ترکیبات microRNA در گیاهان ذاتاً بسیار پایین است و عمدتاً در محدوده فمتومولار تا آتومولار قرار دارد؛ موضوعی که چالش‌ها و در عین حال فرصت‌های مهمی را برای توسعه روش‌های پیشرفته تشخیص فراهم می‌کند (Chen et al., 2023).

غلظت ترکیبات microRNA دخیل در تنش زیستی گیاه

از زیست‌حسگر بهینه‌شده برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات miRNA168 و miRNA397 بهره گرفته شد که نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است. تحقیقات پیشین نقش این دو ترکیب در پاسخ گیاه جو در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی را گزارش کرده‌اند. در این تحقیق، پس از ۱۴ روز از مایه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر، علائم ظاهری بیماری لکه قهوه‌ای روی برگ گیاه به خوبی نمایان شده بود که نمونه‌هایی از آن در شکل ۵ نیز نشان داده شده است. نتایج غلظت ترکیبات microRNA نشان‌دهنده عملکرد مناسب زیست‌حسگر توسعه داده شده در این پژوهش برای بررسی ظهور تنش زیستی در گیاه است.



شکل ۵. (الف) نمونه‌هایی از گیاهان شاهد (سالم)، (ب) نمونه‌هایی از گیاهان آلوده با علائم ظاهری مشخص شده با دایره قرمز، (ج) غلظت ترکیبات miRNA168 و miRNA397 در گیاهان سالم و آلوده

تغییرات در غلظت ترکیبات microRNA تحت تنش‌های زیستی کمک می‌کند تا سازوکار احتمالی دفاع در برابر بیمارگر قابل درک شود. حضور عامل بیماری‌زا یک پاسخ دفاعی چند لایه در جو را برمی‌انگیزد که شامل تنظیم واکنش‌های اکسایش-کاهش، متابولیسم ثانویه و تنظیم پساترجمه‌شن‌ها با واسطه ترکیبات microRNA می‌شود. در مطالعه حاضر، مایه‌زنی برگی عامل بیماری‌زا تنش اکسیداتیو را القا کرد که این موضوع با تغییرات مورفولوژیکی گیاه همراه بود. ترکیب miRNA168 یک microRNA محافظت‌شده است که به طور مستقیم AGO1 را هدف قرار می‌دهد که این ژن جزء اصلی از مجموعه خاموشی القا شده RNA (RISC) به شمار می‌رود (Szweykowska-Kulinska and Jarmolowski, 2018). این ژن برای تنظیم پساترجمه ترکیبات microRNA روی ژن‌های مرتبط

با دفاع ضروری است. افزایش تجمع miRNA168 که پس از اسپری عامل بیماری‌زا مشاهده شد، نشان‌دهنده یک مکانیسم بازخورد فعال برای تنظیم میزان AGO1 در طول فعال‌سازی ایمنی است. در شرایط تنش توسط عامل بیماری‌زا، افزایش بیان miRNA168، بیان AGO1 را سرکوب می‌کند، که باعث جلوگیری از فعالیت بیش از حد خاموش‌سازی RNA که می‌تواند بیان ژن‌های دفاعی را ناپایدار کند، می‌شود (Pertermann et al., 2022). این نوع تنظیم بیان اطمینان می‌دهد که ژن‌های مرتبط با دفاع، از جمله آن‌هایی که در تنش اکسیداتیو و متابولیسم فنیل پروپانوئید دخیل هستند، در صورت نیاز در دسترس باقی می‌مانند (Rose et al., 2019).

ترکیب miRNA397 نیز نقش مکمل را با هدف قرار دادن laccase، آنزیمی کلیدی در پلیمریزاسیون لیگنین و تقویت دیواره سلولی ایفا می‌کند (Pan et al., 2017). ترکیبات laccase سوسترهای فنلی را مصرف می‌کنند تا لیگنین تولید کنند و در نتیجه، دیواره سلولی را در برابر نفوذ عامل بیماری‌زا تقویت می‌کنند (Zhang et al., 2023). افزایش مشاهده‌شده در غلظت miRNA397 ناشی از عامل بیماری‌زا در این مطالعه، نشان‌دهنده سرکوب laccase در مراحل اولیه تنش است. این سرکوب، تشکیل زودهنگام لیگنین را محدود می‌کند و اجازه می‌دهد ترکیبات فنلی به شکل‌های ضد میکروبی خود تجمع یابند (Sharma et al., 2023).

نتایج این بخش نشان می‌دهند که داده‌های به دست آمده از زیست‌حسگر microRNA می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص وضعیت تنش‌های زیستی در گیاهانی مانند جو در اختیار ما قرار دهند. اگرچه به نظر می‌رسد تحقیقات در خصوص اندازه‌گیری غلظت microRNA با استفاده از زیست‌حسگرها به طور عمده به مطالعات روی تشخیص سلامت انسان و بررسی کیفیت دارورسانی و ظهور بیماری‌هایی مانند سرطان تعلق دارد (Kim et al., 2023; Negahdary and Angnes, 2022)، مطالعات در مورد استفاده از زیست‌حسگرهای microRNA برای بررسی سلامتی گیاهان به سرعت در حال رشد است (Chen et al., 2023; Li et al., 2024). مشابه نتایج این تحقیق، آصف‌پور و کیلیان (Asefpour Vakilian, 2020b) نشان داد که زیست‌حسگر microRNA می‌تواند با عملکرد مناسب برای پیش‌بینی تنش‌های محیطی در گیاهچه‌های آراییدوپسیس مورد استفاده قرار گیرد. محمدی و آصف‌پور و کیلیان (Mohammadi and Asefpour Vakilian, 2023) نیز تحقیق مشابهی روی خیار گلخانه‌ای انجام دادند و نشان دادند که بر خلاف ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، ترکیبات microRNA می‌تواند داده‌های مناسبی به منظور شناسایی تنش‌های محیطی ارائه دهند. اگرچه تحقیق حاضر روی یک نوع تنش زیستی (بیماری قارچی لکه قهوه‌ای) در گیاه جو متمرکز است، می‌توان عملکرد زیست‌حسگر معرفی‌شده را برای شناسایی انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی ارقام داخلی محصولات مهم زراعی ایران مانند گندم، ذرت، نیشکر، برنج، سیب‌زمینی، سویا و پنبه با داشتن غلظت ترکیبات microRNA آنها تعمیم داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که داده‌های زیست‌حسگر الکتروشیمیایی microRNA به عنوان جایگزین بسیار مناسبی برای ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد تنش زیستی گیاهی در مراحل اولیه به کشاورزان، مهندسين کشاورزی و گیاه‌پزشکان ارائه کنند. در این شرایط، دیگر نیازی به استخراج ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه، که معمولاً زمان‌بر است و نیاز به انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه‌های مجهز دارد، نخواهد بود. بازه خطی اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA به کمک زیست‌حسگر معرفی‌شده به گونه‌ای بود که تفاوت معناداری میان داده‌های گیاه سالم و گیاه آلوده به بیماری لکه قهوه‌ای مشاهده شد.

هرچند، محدودیت‌های قابل توجهی در استفاده گسترده از روش پیشنهادی در کشاورزی امروز وجود دارد. ترکیبات microRNA ترکیباتی با غلظت بسیار کم (در سطح فمتومولار) در ساختار سلولی گیاهان هستند که به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی و مواد غذایی اعمال شده به گیاه در طول دوران رشد قرار می‌گیرند. کشاورزان عموماً برای دستیابی به حداکثر تولید از برخی تغییرات در روند کودپاشی محصول و یا استفاده از مواد غذایی مکمل و سموم در طول دوره رشد بهره می‌گیرند. همچنین، گیاهان در فضاهای غیر کنترل‌شده مستعد بیماری‌های قارچی و باکتریایی فراوانی هستند. واکنش گیاه در برابر این تغییرات به شکل تغییر در سطوح ترکیبات microRNA نمایان می‌شود. در این شرایط، پیش‌بینی تنش وارده به گیاه با داشتن پایگاه داده‌ای که تنها مبتنی بر داده‌های ترکیبات microRNA است، با خطای زیادی روبرو خواهد شد. رفع این محدودیت، با توسعه پایگاه‌های عظیم داده روی رایانه‌هایی که بتوانند شرایط مختلف رشد و بیماری‌های گیاهی را پوشش دهند، امکان‌پذیر خواهد بود. این موضوع به تحقیقات وسیع در آینده نیازمند است.

ملاحظات اخلاقی

حامی مالی

مقاله حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تحت عنوان «اعتبارات مصوب برای رساله‌های دکتری» انجام شد.

مشارکت نویسندگان

ک.ر. و ک.آ.: طرح موضوع؛ ن.د.: جمع‌آوری داده‌ها، ن.د. و ک.آ.: تحلیل داده‌ها؛ ن.د.: تهیه نسخه اولیه مقاله؛ ک.ر. و ک.آ.: مطالعه و بازبینی مقاله. تمام نویسندگان نسخه منتشرشده مقاله را خوانده و با آن موافقت کرده‌اند.

بیانیه دسترسی به داده‌ها

داده‌های پژوهش حاضر از طریق درخواست از نویسنده مسئول قابل دسترسی است.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به دلیل تأمین مالی پژوهش قدردانی می‌کنند.

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

REFERENCES

- Aina, O., Bakare, O. O., Fadaka, A. O., Keyster, M., & Klein, A. (2024). Plant biomarkers as early detection tools in stress management in food crops: a review. *Planta*, 259(3), 60.
- Asefpour Vakilian, K. (2020a). Determination of nitrogen deficiency-related microRNAs in plants using fluorescence quenching of graphene oxide nanosheets. *Molecular and cellular probes*, 52, 101576.
- Asefpour Vakilian, K. (2020b). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific Reports*, 10, 3041.
- Asefpour Vakilian, K. (2025). A smart multiplexed microRNA biosensor based on FRET for the prediction of mechanical damage and storage period of strawberry fruits. *Plant Molecular Biology*, 115(2), 37.
- Balabin, R. M., & Lomakina, E. I. (2011). Support vector machine regression (SVR/LS-SVM)—an alternative to neural networks (ANN) for analytical chemistry? Comparison of nonlinear methods on near infrared (NIR) spectroscopy data. *Analyst*, 136(8), 1703-1712.
- Basak, P., Gurjar, M. S., Kashyap, N., Kumar, T. P. J., Khokhar, M. K., Jha, S., & Saharan, M. S. (2024). Morphological, pathogenic and molecular analysis of *Bipolaris sorokiniana* inciting spot blotch of barley in India. *Indian Phytopathology*, 77(1), 93-102.
- Chen, L., Fang, Y., Zhou, X., Zhang, M., Yao, R., & Tian, B. (2023). Magnetic DNA nanomachine for on-particle cascade amplification-based ferromagnetic resonance detection of plant MicroRNA. *Analytical Chemistry*, 95(12), 5411–5418.
- Chen, H., Zhou, S., Chen, J., Zhou, J., Fan, K., Pan, Y., & Ping, J. (2024). An integrated plant glucose monitoring system based on microneedle-enabled electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 248, 115964.
- Crawford, B. M., Strobbia, P., Wang, H. N., Zentella, R., Boyanov, M. I., Pei, Z. M., Sun, T. P., Kemner, K. M., & Vo-Dinh, T. (2019). Plasmonic nanoprobe for in vivo multimodal sensing and bioimaging of microRNA within plants. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(8), 7743-7754.
- Derakhshan, N., Rahnama, K., & Asefpour Vakilian, K. (2026). Plant growth promoting and biocontrol potential of endophytic strains of *Cladosporium* spp., under pathogen stress of *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Biological Control*, 218, 106059.
- Ding, Y., Chen, Z., & Zhu, C. (2011). Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of experimental botany*, 62(10), 3563–3573.
- Ding, T., Li, W., Li, F., Ren, M., & Wang, W. (2024). microRNAs: Key regulators in plant responses to abiotic and biotic stresses via endogenous and cross-kingdom mechanisms. *International Journal of Molecular*



- Sciences, 25(2), 1154.
- Dokhanchi, H., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., & Abed-Ashtiani, F. (2022). Characterization of Pyrenophora, Bipolaris, Curvularia and Exserohilum species associated with leaf spot diseases on barley in East Azerbaijan province, using morphological and molecular data. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 11(1), 1-18.
- Dorosti, N., Khatami, S. H., Karami, N., Taheri-Anganeh, M., Mahhengam, N., Rajabvand, N., Asadi, P., Movahedpour, A., & Ghasemi, H. (2023). MicroRNA biosensors for detection of gastrointestinal cancer. *Clinica Chimica Acta*, 541, 117245.
- Ghazvini, H. (2018). The host-pathogen interaction between barley and casual agent of spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) disease: a review. *Crop Breeding Journal*, 8(2), 1-15.
- Hakimian, F., & Ghourchian, H. (2020). Ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of microRNA-155 as a breast cancer risk factor. *Analytica Chimica Acta*, 1136, 1-8.
- Johnson, B. N., & Mutharasan, R. (2014). Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges. *Analyst*, 139(7), 1576–1588.
- Kawakatsu, Y., Hara, M., Kurotani, K. I., Arima, A., Baba, Y., & Notaguchi, M. (2025). A multiplex microfluidic device to detect miRNAs for diagnosis of plant growth status. *Horticulture Research*, 12(3), uhae323.
- Kim, E. R., Joe, C., Mitchell, R. J., & Gu, M. B. (2023). Biosensors for healthcare: Current and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 41(3), 374–395.
- Li, J., Cupil-Garcia, V., Wang, H. N., Strobbia, P., Lai, B., Hu, J., Maiwald, M., Sumpf, B., Sun, T., Kemner, K. M., and Vo-Dinh, T. (2024). Plasmonics Nanorod Biosensor for In Situ Intracellular Detection of Gene Expression Biomarkers in Intact Plant Systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 261, 116471.
- Luo, C., Bashir, N. H., Li, Z., Liu, C., Shi, Y., & Chu, H. (2024). Plant microRNAs regulate the defense response against pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1434798.
- Mahdavi, Z., Dianati Daylami, S., Asefpour Vakilian, K., & Vahdati, K. (2025). Revolutionizing in vitro cultivation: Machine learning-based optimization of nutrients for superior morphology and biochemistry of Phalaenopsis orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 161(2), 33.
- Marabita, F., De Candia, P., Torri, A., Tegner, J., Abrignani, S., & Rossi, R. L. (2016). Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Briefings in Bioinformatics*, 17(2), 204–212.
- Mohammadi, P., & Asefpour Vakilian, K. (2023). Machine learning provides specific detection of salt and drought stresses in cucumber based on miRNA characteristics. *Plant Methods*, 19, 123.
- Mourya, D. T., Yadav, P. D., Mehla, R., Barde, P. V., Yergolkar, P. N., Kumar, S. R., Thakare, J. P., & Mishra, A. C. (2012). Diagnosis of Kyasanur forest disease by nested RT-PCR, real-time RT-PCR and IgM capture ELISA. *Journal of Virological Methods*, 186, 49–54.
- Negahdary, M., & Angnes, L. (2022). Application of electrochemical biosensors for the detection of microRNAs (miRNAs) related to cancer. *Coordination Chemistry Reviews*, 464, 214565.
- Pan, L., Zhao, H., Yu, Q., Bai, L., & Dong, L. (2017). miR397/Laccase gene mediated network improves tolerance to fenoxaprop-P-ethyl in Beckmannia syzigachne and Oryza sativa. *Frontiers in Plant Science*, 8, 879.
- Pan, Y., Peng, Y., Lu, Y., Yao, Y., Yu, W., & Li, C. (2025). Research techniques of miRNA and its regulatory network under biotic and abiotic stresses in plants. *Plant Stress*, 101103.
- Pandey, R., Teig-Sussholz, O., Schuster, S., Avni, A., & Shacham-Diamand, Y. (2018). Integrated electrochemical Chip-on-Plant functional sensor for monitoring gene expression under stress. *Biosensors and Bioelectronics*, 117, 493-500.
- Pertermann, R., Golbik, R. P., Tamilarasan, S., Gursinsky, T., Gago-Zachert, S., Pantaleo, V., Thondorf, I., & Behrens, S. E. (2022). RNA and protein determinants mediate differential binding of miRNAs by a viral suppressor of RNA silencing thus modulating antiviral immune responses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4977.
- Pervaiz, T., Amjid, M. W., El-Kereamy, A., Niu, S. H., & Wu, H. X. (2021). MicroRNA and cDNA-microarray as potential targets against abiotic stress response in plants: Advances and prospects. *Agronomy*, 12(1), 11.
- Rose, L. E., Overdijk, E. J., & van Damme, M. (2019). Small RNA molecules and their role in plant disease. *European Journal of Plant Pathology*, 154(1), 115-128.
- Samadi, S. M., Asefpour Vakilian, K., & Javidan, S. M. (2025). A review of the most important microRNAs involved in fruit postharvest properties. *Food Chemistry Advances*, 9, 101168.

- Seddaoui, N., & Arduini, F. (2025). Recent advances in wearable and implantable electrochemical (bio) sensors for plant health monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 191, 118336.
- Sharbati, M., Asefpour Vakilian, K., & Azadbakht, M. (2025). What do microRNA concentrations tell us about the mechanical damage and storage period of strawberry fruits?. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 10, 100250.
- Sharma, N. K., Yadav, S., Gupta, S. K., Irulappan, V., Francis, A., Senthil-Kumar, M., & Chattopadhyay, D. (2023). MicroRNA397 regulates tolerance to drought and fungal infection by regulating lignin deposition in chickpea root. *Plant, Cell & Environment*, 46(11), 3501-3517.
- Szweykowska-Kulinska, Z., & Jarmolowski, A. (2018). Post-transcriptional regulation of MicroRNA accumulation and function: new insights from plants. *Molecular Plant*, 11(8), 1006-1007.
- Tran, H. V., & Piro, B. (2021). Recent trends in application of nanomaterials for the development of electrochemical microRNA biosensors. *Microchimica Acta*, 188(4), 128.
- Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42, 3184–3196.
- Várallyay, E., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature Protocols*, 3(2), 190–196.
- Veza, I., Spraggon, M., Fattah, I. R., & Idris, M. (2023). Response surface methodology (RSM) for optimizing engine performance and emissions fueled with biofuel: Review of RSM for sustainability energy transition. *Results in Engineering*, 18, 101213.
- Volná, A., Bartas, M., Pečinka, P., Špunda, V., & Červeň, J. (2022). What do we know about barley miRNAs?. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14755.
- Wang, X., Ge, J., He, M., Li, Q., Cai, J., Zhou, Q., Zhong, Y., Wollenweber, B., & Jiang, D. (2023). Enhancing crop resilience: Understanding the role of drought priming in wheat stress response. *Field Crops Research*, 302, 109083.
- Yin, J. Q., Zhao, R. C., & Morris, K. V. (2008). Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 70–76.
- Zhang, Z., Long, Y., Yin, X., Wang, W., Li, W., Jiang, L., Chen, X., Wang, B., & Ma, J. (2023). Genome-wide identification and expression patterns of the laccase gene family in response to kiwifruit bacterial canker infection. *BMC Plant Biology*, 23(1), 591.
- Zhou, Y., Ran, S., Wang, X., Huang, W., & Fang, Z. (2026). Enhancing *Dendrobium huoshanense* ZZ Tang & SJ Cheng tissue culture: a response surface methodology approach for robust plantlet regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 164(2), 53.