



## Detecting abiotic stresses in rice plants using a smart optical biosensor based on gold nanoparticles

Keyvan Asefpour Vakilian 

Department of Biosystems Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

E-mail: [keyvan.asefpour@gau.ac.ir](mailto:keyvan.asefpour@gau.ac.ir)

---

### Article Info

**Article type:** Research Article

**Article history:**

**Received:** July. 30, 2024

**Revised:** Sep. 5, 2024

**Accepted:** Sep. 22, 2024

**Published online:** Spring 2024

**Keywords:**

**Genetic algorithm,  
Machine learning,  
MicroRNA concentration,  
Support vector machine**

---

### ABSTRACT

The specific detection of the type and severity of plant abiotic stresses to take timely measures helps prevent yield reduction. This study introduces a new method to detect the type and severity of stress in rice plants under salinity, drought, and heat conditions by investigating microRNAs. The concentration of eight microRNAs in the tissue of plants subjected to salinity, drought, and heat conditions was measured with the help of an optical biosensor based on gold nanoparticles. The biosensor worked based on probe-target hybridization, in which the mixture of probe/citrate-capped gold nanoparticles (compound 1) and microRNA/polyethyleneimine-capped nanoparticles (compound 2) resulted in the aggregation of nanoparticles and changes in their spectroscopic properties. In the following, machine learning methods were used to predict the type and severity of stress using such concentrations. The results showed that the support vector machine optimized by the genetic algorithm was able to detect the severity of salinity, drought, and heat stress applied to rice plants with appropriate performance and with coefficients of determination of 0.94, 0.91, and 0.86, respectively. Then, the results of feature selection based on the cooperative game theory showed that among the microRNAs studied, miRNA-156, miRNA-393, and miRNA-159 had the largest contribution in predicting drought, salinity, and heat stresses in the rice plants, respectively. The findings of the research show that the examination of plant microRNAs with the help of optical biosensors can lead to reliable features for determining plant growth conditions and plant stresses in the early stage.

---

Cite this article: Asefpour Vakilian, K., (2024) Detecting abiotic stresses in rice plants using a smart optical biosensor based on gold nanoparticles, *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 55 (1), 51-69.  
<https://doi.org/10.22059/ijbse.2024.380124.665559>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.



DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2024.380124.665559>

---

## تشخیص تنش‌های غیر زیستی گیاه برنج با استفاده از یک زیست‌حسگر نوری هوشمند مبتنی بر نانوذرات طلا

کیوان آصف پور و کیلیان ✉

گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، رایانامه: [keyvan.asefpour@gau.ac.ir](mailto:keyvan.asefpour@gau.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	تشخیص اختصاصی نوع و شدت تنش‌های غیر زیستی گیاه به منظور انجام اقدامات به موقع به جلوگیری از کاهش عملکرد کمک می‌کند. این مطالعه روش جدیدی را برای تشخیص نوع و شدت تنش در گیاه برنج در شرایط شوری، خشکی و گرما به کمک بررسی ترکیبات microRNA معرفی می‌کند. در این پژوهش، غلظت هشت ترکیب microRNA در بافت گیاهان قرار گرفته تحت تنش‌های فوق به کمک یک زیست‌حسگر نوری مبتنی بر نانوذرات طلا اندازه‌گیری شد. اساس کار این زیست‌حسگر بر اساس هیبریدیزاسیون پراب-ترکیب هدف بود که در آن، اختلاط پراب/نانوذرات طلای پوشش داده شده با سیترات (ترکیب ۱) و microRNA/نانوذرات پوشش داده شده با پلی‌اتیلن‌ایمین (ترکیب ۲) منجر به تجمع نانوذرات و تغییر ویژگی‌های طیف‌سنجی نمونه می‌شد. در ادامه، از روش‌های یادگیری ماشین برای پیش‌بینی نوع و شدت تنش با داشتن این غلظت‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که ماشین بردار پشتیبان بهینه‌شده توسط الگوریتم ژنتیک با عملکرد مناسب و به ترتیب با ضرایب تعیین ۰/۹۴، ۰/۹۱ و ۰/۸۶ توانایی تشخیص سطح تنش شوری، خشکی و گرمای وارده به گیاهان برنج را داشت. در ادامه، نتایج انتخاب ویژگی مبتنی بر نظریه بازی‌های مشارکتی نشان داد که در میان ترکیبات microRNA مورد مطالعه، miRNA-156، miRNA-393 و miRNA-159 به ترتیب بیشترین سهم را در پیش‌بینی تنش‌های خشکی، شوری و گرما در گیاه برنج داشتند. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که بررسی ترکیبات microRNA گیاه به کمک زیست‌حسگرهای نوری می‌تواند منجر به ویژگی‌های قابل اعتمادی برای تعیین شرایط رشد گیاهی و تنش‌های گیاه در مراحل اولیه ظهور شود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۹	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۶/۱۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۱	
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳	
واژه‌های کلیدی: الگوریتم ژنتیک، غلظت microRNA ماشین بردار پشتیبان، یادگیری ماشین	

استناد: آصف پور و کیلیان؛ کیوان، (۱۴۰۳) تشخیص تنش‌های غیر زیستی گیاه برنج با استفاده از یک زیست‌حسگر نوری هوشمند مبتنی بر نانوذرات طلا، مجله مهندسی

<https://doi.org/10.22059/ijbse.2024.380124.665559>، ۵۵ (۱)، ۶۹-۵۱. بیوسیستم ایران،

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijbse.2024.380124.665559>

## مقدمه

اگرچه خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرند، اما تغییرات آنها در برابر تنش اختصاصی نیست (Asefpour Vakilian, 2019). به عنوان مثال، منابع مختلف تنش می‌تواند منجر به تغییرات مشابه در ارتفاع گیاه و وزن ریشه و اندام هوایی گیاه شود. برای درک جامعی از پاسخ گیاه در برابر تنش در سطح مولکولی و سلولی، بررسی صفاتی که تقریباً در برابر تنش رفتار اختصاصی از خود نشان می‌دهند، مطلوب است. امروزه تشخیص زودهنگام تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاهی با بررسی بیان ترکیبات microRNA در بسیاری از گیاهان زراعی مورد مطالعه قرار گرفته است (Noman and Aqeel, 2017).

ترکیبات microRNA، به عنوان مولکول‌های کوچک RNA غیر کدکننده در موجودات زنده، اگرچه تنها حاوی ۱۷ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند، اما اثرات قابل توجهی بر بیان ژن دارند (Ha and Kim, 2014). اهداف زیستی این ترکیبات در گیاهان به طور عمده پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند رشد گیاه، تنظیم هورمون‌های گیاهی و انتقال سیگنال هستند (Varkonyi-Gasic et al., 2010; Li and Yu, 2021). این ترکیبات همچنین تعیین‌کننده پاسخ گیاهان در برابر تنش هستند (Luo et al., 2022). نور، دما، کمبود و سمیت مواد مغذی، خشکی، شوری و دی‌اکسیدکربن منابع رایج تنش‌های غیر زیستی گیاهی هستند (Gong et al., 2020). بیان ترکیبات microRNA در ارتباط با تنش‌های گیاهی عموماً هم در خصوص اندام گیاه و سطح پیشرفت تنش به صورت اختصاصی عمل می‌کند (Li et al., 2022). شناسایی ترکیبات microRNA پاسخگو در برابر تنش گیاه به افزایش دانش ما در مورد نقش آنها در بهبود مکانیسم تحمل تنش گیاه کمک می‌کند (Asefpour Vakilian, 2020a; Zhang et al., 2022). در واقع، برای درک تحمل تنش در گیاهان، بررسی شبکه‌های تنظیم‌کننده ژن به واسطه ترکیبات microRNA که فرآیندهای زیستی، مانند پاسخ به محیط را کنترل می‌کنند، ضروری است (Ghosh et al., 2022). نقش ساختارهای ژن هدف ترکیبات microRNA در تنظیم پاسخ‌های تنش گیاهی در دهه گذشته به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است (Gao et al., 2022). مطالعات اخیر گزارش داده‌اند که برخی از این ترکیبات یک رفتار تنظیم‌کنندگی بالا (یا پایین) نسبت به چندین تنش گیاهی اعمال می‌کنند، در حالی که برخی از آنها تنها تحت تأثیر یک تنش هستند یا حداقل تنها یکی از نقش‌های آنها مشخص شده است (Patel et al., 2019).

تنش‌های شوری، خشکی و دما از جمله تنش‌های غیر زیستی نامطلوب هستند که می‌توانند بر تولید محصول تأثیر بگذارند و شرایط شدید آنها به طور قابل توجهی بر خواص فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان اثر نامطلوب می‌گذارد (Roychoudhury, 2020 Chandra and). پاسخ گیاه به خشکی با در نظر گرفتن ویژگی‌های فیزیولوژیکی، به عنوان مثال، محتوای نسبی آب و پاسخ‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Batool et al., 2020). تنش شوری از طریق تنش اسمزی و سمیت یونی بر رشد و نمو گیاه اثر می‌گذارد (Behera and Hembram, 2021). گرما با تأثیر منفی بر رشد و چندین فرآیند فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تنفس و جذب مواد مغذی، عملکرد کلی گیاه و کیفیت محصول را کاهش می‌دهد و می‌تواند باعث آسیب غشاء سلولی شود (Guy et al., 1999). پاسخ گیاهان به چنین تنش‌های اغلب پیچیده است. در حالی که برخی مطالعات در مورد کاهش فتوسنتز و زیست‌توده بر اثر تنش گرمایی تأکید داشته‌اند، مطالعات جدیدتر اثرات تنش بر فنولوژی، عملکرد دانه، کیفیت تغذیه، دناوره شدن پروتئین، کاهش غلظت پروتئین و غیر فعال شدن آنزیم‌های مربوط به فتوسنتز و متابولیتهای ضروری را مورد بررسی قرار داده‌اند (Mishra et al., 2023).

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از محصولات غذایی اصلی در سرتاسر جهان بوده و منبع اصلی مواد معدنی در رژیم‌های غذایی مبتنی بر برنج است. چندین ترکیب microRNA در گیاه برنج شناسایی شده‌اند که در پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی نقش دارند. مطالعات نشان می‌دهد که برخی ترکیبات microRNA مانند miRNA-156، miRNA-159، miRNA-164، miRNA-169، miRNA-393، miRNA-395، miRNA-402 و miRNA-528 در گیاه برنج به‌طور قابل توجهی به تنش‌های غیر زیستی واکنش نشان می‌دهند (Das et al., 2021). ژن‌های/فاکتورهای رونویسی هدف این ترکیبات در برنج به ترتیب SPL9، MYB/TCP، NAC، NFY-A5، TIR1، AST، DCL1 و DML3 هستند. با اینکه عملکرد اغلب این ژن‌ها و یا فاکتورهای رونویسی در گیاه برنج به خوبی مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است، کارکرد جامع همه آنها برای تعیین وضعیت مورفولوژی و فیزیولوژی گیاه در برابر تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری، خشکی

۱ Up-regulation

۲ Down-regulation

و گرما هنوز به مطالعات گسترده‌ای نیاز دارد (Kumar et al., 2024).

چندین روش مهم، از جمله ریزآرایه‌ها<sup>۱</sup> (Yin et al., 2008)، بلاتینگ شمالی<sup>۲</sup> (Várallyay et al., 2008) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز<sup>۳</sup> (PCR) (Marabita et al., 2016)، برای اندازه‌گیری بیان ترکیبات microRNA موجود در گیاهان به کار رفته است. هرچند، این روش‌ها دارای محدودیت‌های مختلفی، مانند کمترین حد تشخیص نامطلوب، محدوده خطی کوچک و حساسیت کم هستند (Mourya et al., 2012; Turner, 2013). در عوض، حسگرهایی که دارای گیرنده زیستی زنده هستند و زیست‌حسگر نامیده می‌شوند، به عنوان یک روش قابل اعتماد برای تشخیص دقیق و حساس غلظت ترکیبات microRNA توسعه یافته‌اند (Johnson and Mutharasan, 2014). ساخت زیست‌حسگرهای نوری و یا الکتروشیمیایی قابل حمل برای تشخیص اختصاصی و حساس ترکیبات microRNA که در تنش‌های خشکی، شوری و گرمای گیاه برنج دخیل هستند، برای مطالعه پاسخ گیاه در سطح مولکولی مفید به نظر می‌رسد. امروزه صدها زیست‌حسگر نوری با ویژگی‌های کارکردی قابل قبول و محدوده خطی گسترده برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA در سطوح اتمی و فتمومولار معرفی شده‌اند (Tran and Piro, 2021; Dorosti et al., 2022).

روش‌های یادگیری ماشین به طور گسترده در زمینه علوم گیاهی برای مدل‌سازی رفتار گیاه در حین کاشت، نگهداری، برداشت و پس از برداشت توسعه یافته‌اند (Hashemi et al., 2014; Esmaili et al., 2021; Javidan et al., 2023). ماشین قادر به یادگیری روابط پیچیده چندمتغیره میان ورودی و خروجی با استفاده از داده‌های آموزشی است (Sarlaki et al., 2021). استفاده از یادگیری ماشین برای تجزیه و تحلیل محاسباتی نقش ترکیبات microRNA در تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاهی در حال رشد است، زیرا این مسائل ما با مجموعه داده‌های بزرگ روبرو می‌باشد. به تازگی، محققان نرم‌افزارهایی کاربردی برای پیش‌بینی نقش ترکیبات microRNA در تنش‌های غیر زیستی ارائه کرده‌اند (Meher et al., 2022; Pradhan et al., 2023; Mohammadi and Asefpour Vakilian, 2023). آنها گزارش داده‌اند که ابزارهای معرفی شده می‌توانند به طور مؤثر برای پیش‌بینی بزرگ‌مقیاس ترکیبات microRNA در تنش‌های غیر زیستی اختصاصی با استفاده از اطلاعات توالی مورد استفاده قرار گیرند.

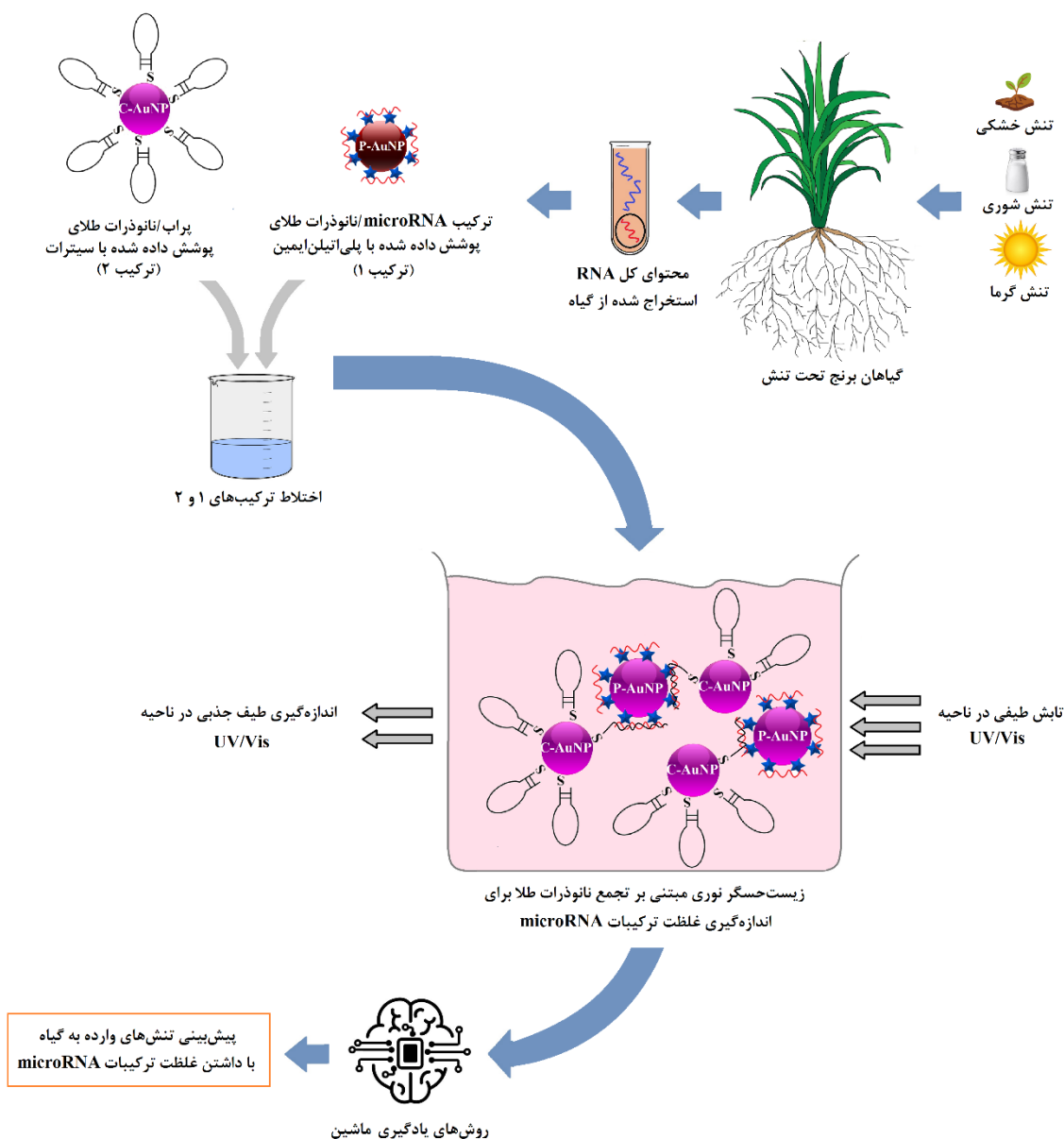
انتخاب ویژگی یکی از موضوعات اساسی در زمینه‌های یادگیری ماشین و تشخیص الگو است (Li et al., 2017). چندین رویکرد در الگوریتم‌های انتخاب ویژگی به کار گرفته شده است، مانند: روش‌های ادغام کردن، بسته‌بندی کردن و فیلتر کردن (Venkatesh and Anuradha, 2019). این روش‌ها از معیارهای ارزیابی مختلفی برای امتیازدهی به ویژگی‌های ورودی روش‌های یادگیری ماشین استفاده می‌کنند (Javidan et al., 2022). در میان این معیارها، اندازه‌گیری‌های مبتنی بر نظریه‌های اطلاعاتی با توجه به الگوریتم کارآمد خود توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند (Hancer et al., 2018). برخلاف روش‌های انتخاب ویژگی مرسوم که ویژگی‌هایی را که به شکل قابل توجهی با ویژگی‌های دیگر همبستگی دارند، کنار می‌گذارند، روش‌های انتخاب ویژگی مبتنی بر نظریه اطلاعاتی مانند نظریه بازی‌های مشارکتی، ویژگی‌هایی را که به تنهایی ضعیف هستند ولی به عنوان یک عضو گروه که در کنار ویژگی‌های دیگر عملکرد مناسبی از خود نشان می‌دهند، نادیده نمی‌گیرند. در این شرایط، اگر پیش‌بینی تنش‌های گیاهی با داشتن غلظت ترکیبات microRNA در نظر گرفته شود، دقت پیش‌بینی هدف (نوع و سطوح تنش) به عنوان یک بازی در نظر گرفته می‌شود که در آن ویژگی‌ها (غلظت ترکیبات microRNA) بازیکنان هستند و باید تیمی از بازیکنان انتخاب شوند که بتوانند بهترین نتایج (پیش‌بینی مناسب تر تنش گیاهی) را کسب کنند (Asefpour Vakilian, 2020b). در این روش به هر ویژگی امتیازی تعلق می‌گیرد و ویژگی‌هایی که با امتیازات پایین شناسایی می‌شوند را می‌توان در اندازه‌گیری‌ها حذف کرد.

در صورت به دست آوردن یک پایگاه داده شامل غلظت ترکیبات مختلف microRNA گیاهان برنج تحت تنش‌های شوری، خشکی و گرما، یک سوال مهم مطرح می‌گردد: کدام یک از این ویژگی‌ها باید به روش‌های یادگیری ماشین برای تشخیص قابل اعتماد نوع و شدت تنش آموزش داده شود؟ از این رو، اهداف این مطالعه عبارتند از: (الف) بکارگیری یک زیست‌حسگر نوری برای جمع‌آوری داده‌های غلظت ترکیبات microRNA در گیاهان برنج تحت تنش؛ (ب) بکارگیری الگوریتم‌های یادگیری ماشین برای تشخیص اختصاصی تنش وارده به گیاهان؛ و (ج) شناسایی سهم هر یک از ترکیبات microRNA در تشخیص کارآمد تنش‌های وارده به گیاهان به کمک روش‌های انتخاب ویژگی.

<sup>۱</sup> Microarrays<sup>۲</sup> Northern blotting<sup>۳</sup> Polymerase chain reaction

### مواد و روش‌ها

شکل ۱ مراحل مختلف این پژوهش را نشان می‌دهد. در ابتدا، تنش‌های شوری، خشکی و گرما در سطوح مختلف بر روی بوته‌های جوان برنج به صورت جداگانه و همزمان اعمال شد و غلظت ترکیبات مختلف microRNA گیاه برنج که در تحقیقات قبلی نتیجه شده است که مرتبط با پاسخ گیاه در برابر این تنش‌ها هستند، در ریشه و ساقه گیاهان اندازه‌گیری شد تا یک پایگاه داده مفید برای آموزش ماشین ایجاد شود. سپس، شبکه عصبی مصنوعی، ماشین بردار پشتیبان و درخت تصمیم برای پیش‌بینی نوع تنش و شدت آن با استفاده از مجموعه داده به دست آمده مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱. روش پیشنهادی برای پیش‌بینی تنش‌های وارد شده به گیاه برنج با داشتن غلظت ترکیبات microRNA و بهره‌گیری از یادگیری ماشین

### مواد گیاهی، شرایط رشد و اعمال تیمارها

کشت گیاهان در یک مزرعه تحقیقاتی در فاصله ۱۰ کیلومتری گرگان، استان گلستان انجام شد. بذور برنج رقم فجر ( *Oryza sativa* cv. Fajr) که از ارقام پربازده با سطح زیر کشت قابل توجه در ناحیه شمال شرق کشور است، پس از ضدعفونی توسط هیپوکلریت سدیم، به مدت هفت روز در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی، جوانه‌های برنج در محلول اصلاح شده یوشیدا به

مدت ۱۲ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد کردند (Yoshida et al., 1971). محلول هر سه روز یکبار تعویض می‌شد. پس از گذشت ۱۴ روز، گیاهچه‌ها به مدت هفت روز تحت تنش‌های شوری (با غلظت صفر-شاهد، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید)، خشکی (با اعمال فشار اسمزی صفر-شاهد، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار به وسیله پلی‌اتیلن‌گلیکول) و گرما (۲۸-شاهد، ۳۱، ۳۴ و ۳۷ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. در هر روز از طول دوره اعمال تنش، نمونه‌برداری از ریشه و ساقه گیاهچه‌ها انجام شد. سطوح تنش‌ها برای بررسی امکان پیش‌بینی تنش‌های ضعیف، متوسط و قوی انتخاب شده بود. در شرایط تنش قوی، لوله شدن قابل توجه برگ‌ها مشاهده می‌شد. آزمایش با ۱۰ تکرار انجام شد تا یک پایگاه داده مناسب برای آموزش به روش‌های یادگیری ماشین ایجاد گردد. پس از نمونه‌برداری از گیاهان، نمونه‌ها جهت استخراج محتوای RNA کل در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

#### اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA به کمک زیست‌حسگر نوری

در این پژوهش، غلظت ترکیبات miRNA-528 و 402 در نمونه‌های جمع‌آوری شده اندازه‌گیری شد. با توجه به تعداد نمونه‌ها و تعداد ترکیبات قابل اندازه‌گیری در این تحقیق، استفاده از روش‌های زمان‌بر مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای اندازه‌گیری میزان بیان ترکیبات microRNA به ماه‌ها فعالیت آزمایشگاهی نیاز داشت. به علاوه، دستیابی به نتایج قابل تحلیل توسط روش PCR معمولاً نیاز به اپراتور متخصص برای اندازه‌گیری‌ها دارد. به این منظور، از یک زیست‌حسگر نوری به عنوان یک روش جایگزین استفاده شد. این زیست‌حسگر بر اساس هیبریدیزاسیون پراب-ترکیب هدف کار می‌کرد که این هیبریدیزاسیون منجر به تجمع نانوذرات طلا می‌شد. آزمایش‌ها در آزمایشگاه سنسور و بیوسنسور گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

محتوای کل RNA نمونه‌ها به کمک پروتکل ترايزول استخراج گردید. به این منظور، نمونه خشک و پودر شده با ۱ میلی‌لیتر ترکیب تجاری ترايزول مخلوط شد. پس از همگن کردن در میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه شد. مایع به دست آمده پس از قرار گرفتن در انکوباتور با یخ به مدت ۱۰ دقیقه، در سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته شد. پس از گذشت این مدت، دو فاز تشکیل شد. از قسمت بالایی محلول هر میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر جدا شده و با ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول به مدت ۱۰ دقیقه در یخ انکوبه شد. نمونه دوباره در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. مواد رویی تیوب‌ها دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. نمونه دوباره در سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و ترکیب به دست آمده برای دستیابی به محتوای کل RNA در مجاورت هوا خشک شد.

برای آماده‌سازی زیست‌حسگر، توالی‌های الیگونوکلوئوتیدی خالص شده به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup> (HPLC)، اسید کلروآوریک (HCl<sub>4</sub>HAu)، پلی‌اتیلن‌ایمین، تری‌سدیم‌سیترات دی‌هیدرات (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)، کلرید هیدروژن و توئین ۲۰ از شرکت بازرگانی نوین زیست‌فناوران پیروز خریداری شد. نانوذرات پوشش‌دار شده با سیترات از طریق واکنش کاهش سیترات سنتز شد. برای این منظور، ۱/۵ میلی‌لیتر سیترات سدیم به محلول در حال جوش HCl<sub>4</sub>HAu اضافه شد (Ji et al., 2007). برای اتصال پراب به نانوذرات، ۴۰۰ میکرولیتر نانوذرات حاوی سیترات با ۲ میکرولیتر توئین ۲۰ و ۴۰۰ میکرولیتر پراب تیوله (۱ میکرومولار) مخلوط شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۱۰ هزار دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب قرمز روغنی دوباره در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه پراکنده شد (ترکیب ۱). نانوذرات پوشیده شده با پلی‌اتیلن‌ایمین به روش کاهش (احیا) حرارتی سنتز شدند (Hakimian et al., 2018). در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر پلی‌اتیلن‌ایمین به ۳ میلی‌لیتر اسید کلروآوریک ۱/۵ مولار که با شیکر آزمایشگاهی در حال هم‌زدن بود، اضافه شد. سپس محصول با استفاده از غشاء در برابر آب دیونیزه دیالیز شد. پس از آن، ۵ میکرولیتر از محلول microRNA هدف با غلظت نامشخص با ۴۰ میکرولیتر محلول به دست آمده انکوبه شد (ترکیب ۲).

با مخلوط کردن ۵ میکرولیتر از ترکیب‌های ۱ و ۲، هیبریداسیون پراب-توالی هدف رخ داد. این واکنش منجر به کاهش فاصله بین نانوذرات و تجمع مبتنی بر اتصال عرضی بین ذرات شده و رنگ مخلوط از قرمز به صورتی تغییر می‌کند و شدت جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر کاهش می‌یابد، در حالی که شدت جذب نور در ۷۵۰ نانومتر افزایش می‌یابد. از آنجا که جذب UV-Vis در طول موج‌های ۵۳۰ و

<sup>۱</sup> Polyethylene glycol

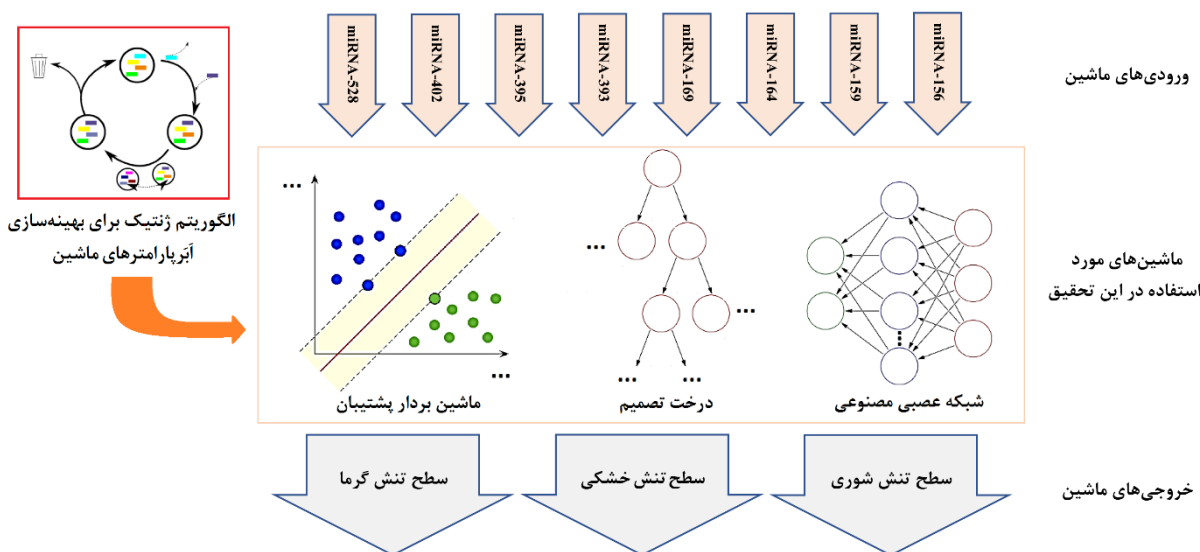
<sup>۲</sup> Polymerase chain reaction

<sup>۳</sup> High performance liquid chromatography

۷۵۰ نانومتر به ترتیب نشان‌دهنده مقدار نانوذرات طلای پراکنده و تجمع یافته است (Chen et al., 2008)، نسبت جذب بزرگ‌تر  $750/530$  نانومتر را می‌توان به عنوان میزان بیشتر هیبریدزاسیون پراب-هدف و در نتیجه، غلظت بالاتر توالی microRNA هدف در ترکیب ۲ در نظر گرفت. طیف‌های جذبی UV-Vis پس از ۱۵ دقیقه واکنش با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی (SpectraMax iD5, Molecular Devices, USA) ثبت گردید.

### آماده‌سازی پایگاه داده و پیاده‌سازی روش‌های یادگیری ماشین

به کمک نمونه‌های استاندارد غلظت microRNA نمودارهای واسنجی برای تعیین ارتباط رگرسیونی میان نسبت جذب طیفی  $750/530$  نانومتر و غلظت ترکیبات microRNA بر حسب فمتومولار به دست آمد. از داده‌های به دست آمده برای تشکیل یک ماتریس بهره گرفته شد که در آن، هر سطر نشان‌دهنده اطلاعات یک نمونه گیاه مورد ارزیابی بود، در حالی که هر ستون نشان‌دهنده هر یک از اطلاعات سطوح تنش و یا یکی از غلظت‌های ترکیبات microRNA اندازه‌گیری شده بود. از آنجا که سطوح تنش‌های شوری، خشکی و دما به ترتیب ۶، ۴ و ۶ بوده و آزمایش با ۱۰ تکرار انجام شد، تعداد نمونه‌ها (و یا به بیان دیگر، تعداد سطرهای ماتریس داده‌ها) ۱۴۴۰ بود. با توجه به این که هدف اصلی این پژوهش، پیش‌بینی سطوح تنش وارده به گیاه بود، هشت ستون شامل داده‌های غلظت ترکیبات microRNA به عنوان ورودی مدل‌های یادگیری ماشین در نظر گرفته شد، در حالی که سه ستون مربوط به سطوح تنش‌های شوری، خشکی و گرما به عنوان خروجی‌های مدل در نظر گرفته شدند. شکل ۲ ماشین‌های مورد استفاده در این تحقیق و ورودی‌ها و خروجی‌های آنها را نشان می‌دهد. از آنجا که خروجی مدل‌ها سطوح تنش بودند، داده‌هایی که ماشین‌ها باید پیش‌بینی می‌کردند، از جنس کمی بودند. سطوح هر یک از تنش‌ها بین صفر و یک نرمالیزه شده بودند تا امکان مقایسه ماشین‌ها در پیش‌بینی هر یک از تنش‌ها امکان‌پذیر باشد (Massah and Asefpour Vakilian, 2019).



شکل ۲. ماشین‌های مورد استفاده در این تحقیق به همراه ورودی‌ها و خروجی‌های آنها

شبکه عصبی مصنوعی، ماشین بردار پشتیبان و درخت تصمیم به عنوان مدل‌های یادگیری ماشین برای آموزش داده‌ها استفاده شدند. یک شبکه سه‌لایه پرسپترون با الگوریتم یادگیری لونیبرگ مارکوارت (حاوی ۱۰ گره (نرون) در لایه یادگیرنده به عنوان شبکه عصبی مصنوعی در نظر گرفته شد. از کرنل تابع پایه شعاعی (گاوسی) برای توسعه روش ماشین بردار پشتیبان بهره گرفته شد. درخت تصمیم نیز با حداکثر ۲۰ سطح هرس مورد استفاده قرار گرفت. هر یک از این ماشین‌ها دارای آبرپارامترهایی هستند که انتخاب صحیح مقدار آنها می‌توان عملکرد ماشین را در طول فرآیند یادگیری به طور قابل توجهی بهبود بخشید (Schratz et al., 2019; Pannakkong et al., 2022).

۱ Levenberg–Marquardt learning algorithm

۲ Kernel

۳ Gaussian kernel

۴ Hyperparameters



در این تحقیق، مقادیر وزن و بایاس گره‌ها در شبکه عصبی مصنوعی، پارامتر کرنل و ضریب هزینه در ماشین بردار پشتیبان و حداقل تعداد نمونه‌های آموزشی در هر برگ و در هر شاخه در درخت تصمیم به عنوان آبرپارامترها بهینه شدند.

بهینه‌سازی مقادیر آبرپارامترها با روش‌های مختلفی قابل انجام است. امروزه از روش‌های فراابتکاری مبتنی بر هوش جمعیتی به این منظور استفاده می‌شود (Asefpour Vakilian, 2022; 2023a). الگوریتم ژنتیک که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت، یکی از روش‌های فراابتکاری است که شامل مجموعه‌ای از کروموزوم‌های تصادفی است که راه‌حل‌های ممکن برای یک مسئله بهینه‌سازی را توصیف می‌کند. در طول چندین مرحله تکرار که نسل نامیده می‌شوند، کروموزوم‌هایی که منجر به مقادیر مناسب‌تر تابع برازندگی می‌شوند، زنده می‌مانند و برای ایجاد فرزندان جدیدی در نسل‌های بعدی که احتمالاً به راه‌حل بهینه نزدیک‌تر هستند، استفاده شوند. تابع برازندگی در این تحقیق به حداقل رساندن خطای پیش‌بینی تنش‌های وارده به گیاه به کمک روش‌های یادگیری ماشین بود. حداکثر تعداد تکرار (نسل)، اندازه جمعیت و درصد جهش در این روش به ترتیب ۲۰۰، ۵۰ و ۲ در نظر گرفته شد.

از طرف دیگر، ورودی‌های مدل‌های یادگیری ماشین اهمیت یکسانی در پیش‌بینی خروجی‌های مدل ندارند (Sun et al., 2012). نظریه بازی‌های مشارکتی یک روش انتخاب ویژگی قابل اعتماد در مسائل چندمتغیره است که در این پژوهش برای تعیین اهمیت (تأثیر) هر یک از ترکیبات microRNA در پیش‌بینی پاسخ تنش گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. این نظریه، میزان اطلاعات به اشتراک گذاشته شده (یعنی توان یا اهمیت) توسط ورودی‌های مدل را با استفاده از شاخص توان بانزاف ارزیابی می‌کند (Sun et al., 2018). این الگوریتم مطابق روش ذکر شده توسط آصف پور و کیلیان (Asefpour Vakilian, 2020b) مورد استفاده قرار گرفت.

از محیط برنامه‌نویسی نرم‌افزار MATLAB برای پیاده‌سازی الگوریتم‌های یادگیری ماشین استفاده شد. برای آموزش و آزمون ماشین‌ها از روش اعتبارسنجی عرضی پنج‌تایی استفاده شد. در این روش، تمامی داده‌های پایگاه داده به پنج قسمت مساوی تقسیم شده و در مرحله اول، یک قسمت از این داده‌ها به عنوان آزمون انتخاب شده، در حالی که چهار قسمت دیگر برای آموزش ماشین مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مرحله دوم، قسمت دیگری به عنوان آزمون انتخاب می‌شود و مابقی داده‌ها مجدداً برای آموزش استفاده می‌شوند. این عملیات پنج بار تکرار می‌شود تا هر قسمت یک‌بار به عنوان آزمون در نظر گرفته شده باشد. مزیت این روش نسبت به روش‌های دیگر مانند انتخاب تصادفی داده‌های آزمون این است که تمام داده‌ها حداقل یک‌بار به عنوان آزمون مورد بررسی قرار می‌گیرند. از آنجا که در میان ماشین‌های مورد ارزیابی، شبکه عصبی مصنوعی علاوه بر داده‌های آموزش و آزمون، به داده‌های اعتبارسنجی نیاز دارد تا کیفیت آموزش شبکه را تشخیص دهد، ۲۰ درصد از داده‌های آموزش در هر مرحله، به فرآیند اعتبارسنجی اختصاص داده شد. میانگین مربعات خطا (MSE) (رابطه ۱) و ضریب تبیین ( $R^2$ ) (رابطه ۲) برای داده‌های آزمون به عنوان معیارهای ارزیابی عملکرد ماشین‌ها در پیش‌بینی سطوح تنش ثبت گردید

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

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

که در این روابط، مقدار مشاهداتی است که باید توسط ماشین پیش‌بینی شود (سطوح تنش وارده به گیاه در طول آزمایش)، مقدار  $x_p$  مقدار پیش‌بینی شده سطح تنش 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 تحقیق گزارش گردید. همان‌طور که پیش‌تر ذکر گردید، به منظور ایجاد امکان مقایسه عملکرد ماشین‌ها در پیش‌بینی هر یک از تنش‌ها، مقادیر تنش در ماتریس داده‌ها بین صفر و یک نرمالیزه شده بود.

## نتایج و بحث

### عملکرد ماشین‌ها در پیش‌بینی سطح تنش

جدول ۱ عملکرد الگوریتم‌های مختلف یادگیری ماشین در پیش‌بینی تنش‌های وارده به گیاه برنج را با داشتن غلظت ترکیبات microRNA اندازه‌گیری شده در این مطالعه نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های این جدول، غلظت‌های microRNA به عنوان ورودی‌های ماشین،



توانایی پیش‌بینی نوع و شدت تنش‌های سه‌گانه خشکی، شوری و گرما در گیاه برنج را داشتند. این جدول همچنین اثر بهینه‌سازی آبرپارامترهای ماشین‌ها بر عملکرد را نشان می‌دهد که حاکی از تأثیر قابل توجه این بهینه‌سازی بر عملکرد مدل است. مناسب‌ترین نتایج پیش‌بینی مربوط به ماشین بردار پشتیبان بهینه شده با الگوریتم ژنتیک بود که توانست به ترتیب با ضرایب تبیین ۰/۹۴، ۰/۹۱ و ۰/۸۶ سطح تنش شوری، خشکی و گرمای وارده به گیاهان برنج را پیش‌بینی کند. در صورت عدم بهینه‌سازی ماشین‌های مورد مطالعه در این تحقیق، حداکثر ضرایب تبیین پیش‌بینی سطوح تنش شوری، خشکی و گرما به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۸۲ و ۰/۶۱ بود که برای تعیین کارآمد تنش‌ها کافی نیستند. شکل ۳ پراکندگی سطوح واقعی تنش و مقادیر پیش‌بینی شده توسط هر ماشین بهینه‌شده توسط الگوریتم ژنتیک را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، غلظت ترکیبات microRNA در برابر سطوح مختلف تنش‌ها تغییر کرده است. اگر چنین نبود، روش‌های یادگیری ماشین قادر به پیش‌بینی تنش با عملکرد قابل اعتماد نبودند. برخی از ترکیبات microRNA در برابر شرایط تنش افزایش بیان یافته‌اند، در حالی که برخی دیگر مهار شدند. از منظر رویکردهای یادگیری ماشین، فرقی نمی‌کند که غلظت کدام microRNA افزایش و کدام ترکیب‌ها کاهش یافته است. آنچه مهم است این است که رفتار این ترکیبات در برابر تنش تا حد قابل توجهی اختصاصی بوده است و ماشین توانسته است این رفتار را کشف کند.

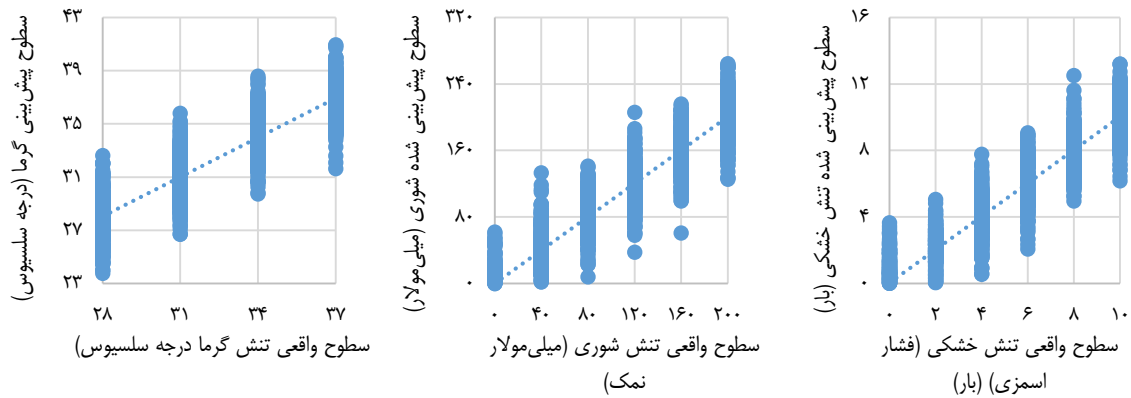
جدول ۱. عملکرد ماشین‌ها در پیش‌بینی تنش‌های وارده به گیاه برنج با داشتن غلظت ترکیبات microRNA

نوع بهینه‌سازی آبرپارامترها				نوع تنش	نوع ماشین
الگوریتم ژنتیک		بدون بهینه‌سازی			
R <sup>2</sup>	MSE	R <sup>2</sup>	MSE		
۰/۸۵	۰/۰۱۵۴	۰/۶۴	۰/۱۰۵۶	خشکی	شبکه عصبی مصنوعی
۰/۸۵	۰/۰۱۵۴	۰/۷۹	۰/۰۳۲۳		
۰/۷۹	۰/۰۳۲۳	۰/۳۳	۰/۴۱۴۳		
۰/۹۱	۰/۰۰۵۰	۰/۸۲	۰/۰۲۳۰	خشکی	ماشین بردار پشتیبان
۰/۹۴	۰/۰۰۲۱	۰/۷۷	۰/۰۳۹۴		
۰/۸۶	۰/۰۱۳۲	۰/۴۹	۰/۴۷۰۷		
۰/۸۵	۰/۰۱۵۴	۰/۷۴	۰/۰۵۱۶	خشکی	درخت تصمیم
۰/۸۴	۰/۰۱۷۷	۰/۶۸	۰/۰۸۱۵		
۰/۸۰	۰/۰۲۹۰	۰/۶۱	۰/۱۲۶۰		

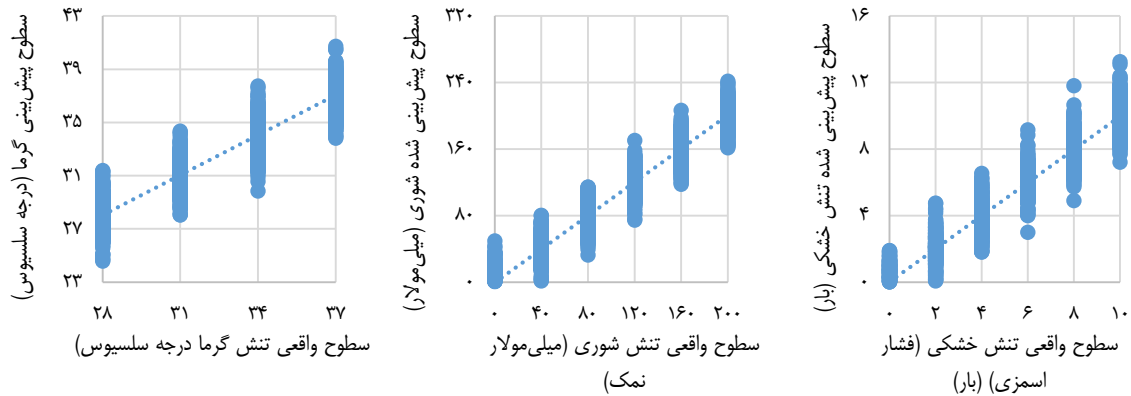
در حین پیش‌بینی سطوح مختلف تنش‌ها، ماشین‌های بهینه‌شده مورد مطالعه گاه‌گاه مقادیر تنش خشکی و شوری را به صورت مقادیر منفی پیش‌بینی می‌کردند، به خصوص در شرایط شاهد که مقادیر عددی تنش به صورت صفر در پایگاه داده قرار داده شده بود. از آنجا که مقادیر منفی برای این تنش‌ها تعریف نشده است، هر جا که ماشین برای تنش‌ها مقدار منفی را پیش‌بینی می‌کرد، این مقدار صفر در نظر گرفته می‌شد تا مقادیر منفی در میان مقادیر پیش‌بینی شده ماشین‌ها وجود نداشته باشد. شکل ۳ نیز این موضوع را نشان می‌دهد که حداقل مقدار پیش‌بینی شده برای تنش‌های شوری و خشکی برابر با صفر ثبت گردیده است.

بر اساس جدول ۱، ماشین بردار پشتیبان در مقایسه با دو ماشین دیگر عملکرد مناسب‌تری از خود نشان داد. همچنین، شکل ۳ حاکی از پراکندگی کمتر داده‌های پیش‌بینی و تجمع آنها حول داده‌های واقعی در ماشین بردار پشتیبان است. محققین پیشین نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند که نشان می‌دهد شبکه عصبی مصنوعی به تنهایی و بدون بهینه‌سازی ساختار عملکرد مناسبی در زمینه کشاورزی نداشته است (Chandar et al., 2024). شبکه‌های عصبی مصنوعی به عنوان ابزارهای قدرتمندی برای حل مسائل پیچیده در زمینه‌های مختلف شناخته می‌شوند. با این حال، آنها اغلب به عنوان مدل‌های جعبه سیاه در نظر گرفته می‌شوند؛ به این معنی که برای رسیدن به جواب مؤثر شفافیت کافی را ندارند. این امر به ویژه برای مدل‌های پیچیده و عمیق، چالش بیشتری را به وجود می‌آورد که موجب کاهش دقت در پیش‌بینی می‌شود (Rudin and Radin, 2019). همچنین شبکه‌های عصبی مصنوعی عموماً به حجم قابل توجهی از داده برای آموزش نیاز دارند، به ویژه زمانی که با فضاهای ورودی با ابعاد بالا سر و کار دارند. در صورت عدم دسترسی به داده‌های کافی، این شبکه‌ها ممکن است عملکرد ناپایداری داشته باشند (Aliferis and Simon, 2024). از دیگر دلایل می‌توان به این موضوع اشاره کرد که آموزش شبکه عصبی مصنوعی، می‌تواند به مقدار قابل توجهی از منابع محاسباتی نیاز داشته باشد که این امر آموزش را زمان‌بر می‌کند و به منابع محاسباتی قابل توجهی نیاز دارد. اما ماشین بردار پشتیبان در فضاهای با ابعاد متوسط (مانند پایگاه داده مورد استفاده در این پژوهش با تعداد هشت

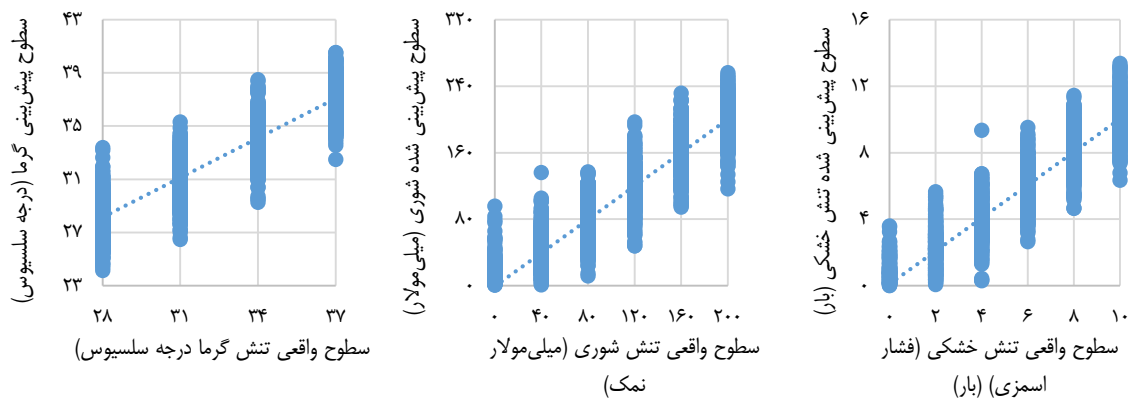
ورودی) عموماً به خوبی عمل می‌کند. در بعضی مسائل یادگیری ماشین شامل فضاهای با ابعاد بسیار بالا، عملکرد این روش ممکن است کاهش یابد. این موضوع گاهی به این دلیل است که داده‌ها در این فضاها پراکنده می‌شوند و پیدا کردن یک صفحه جداکننده موثر بسیار دشوار می‌شود (Bzdok et al., 2017). ماشین بردار پشتیبان برای تبدیل فضای ورودی به فضایی با ابعاد بالاتر که در آن داده‌ها قابل تفکیک‌تر باشند، به توابع کرنل متکی است. انتخاب مناسب و تنظیم آبرپارامترهای کرنل می‌تواند چالش برانگیز باشد و اغلب نیاز به تخصص در زمینه یا آزمایش‌های گسترده دارد (Liu and Xu, 2014).



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۳. نمودارهای پراکندگی داده‌های واقعی و پیش‌بینی شده تنش توسط ماشین‌های بهینه‌شده به کمک الگوریتم ژنتیک. (الف) شبکه عصبی مصنوعی، (ب) ماشین بردار پشتیبان، و (ج) درخت تصمیم.

در ماشین بردار پشتیبان فرض می‌شود که طبقه‌ها توسط یک آبرصفحه قابل تفکیک هستند. بنابراین، اگر طبقه‌ها به طور قابل توجهی همپوشانی داشته باشند، این فرض ممکن است درست نباشد. در چنین مواردی، ماشین ممکن است برای یافتن یک مرز تصمیم

مناسب با مشکل مواجه شود که منجر به عملکرد ضعیف یا نیازمند به روش‌های پیچیده می‌شود. درخت تصمیم که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، عملکرد مناسبی از خود نشان نداد. این روش به عنوان ابزاری برای به تصویر کشیدن و تحلیل تصمیم، در جایی که مقادیر مورد انتظار از رقابت‌ها متناوباً محاسبه می‌شود، استفاده می‌گردد (Song and Ying, 2015). تحقیقات دیگر نیز نشان داده‌اند که درخت تصمیم در مسائل حوزه زیستی و کشاورزی کارآمد نیست (Asefpour Vakilian, 2020b).

از طرفی دیگر، نتایج ماشین‌های بهینه‌شده توسط الگوریتم ژنتیک نشان می‌دهد بهینه‌سازی آبرپارامترها نتایج بهتری را در پی داشته‌است. طبق نتایج محققین پیشین، بهینه‌سازی پارامترهای ماشین موجب بهبود عملکرد آن می‌شود. الگوریتم ژنتیک در یافتن راه‌حل‌های مناسب در فضاهای جستجوی بزرگ و پیچیده عملکرد قابل توجهی دارد. به همین دلیل، در شرایطی که روش‌های مبتنی بر گرادیان ممکن است برای یافتن بهترین راه‌حل مشکل داشته باشند، الگوریتم ژنتیک می‌تواند یک جایگزین کارآمد باشد (Bajpai and Kumar, 2010). الگوریتم ژنتیک می‌تواند چندین راه حل را با استفاده از جمعیتی از ذرات کشف کند. این قابلیت جستجوی موازی به الگوریتم این اجازه را می‌دهد تا فضای جستجو را کاوش کند و در سریع‌ترین زمان ممکن بهترین راه حل را بیابد. الگوریتم ژنتیک در مقایسه با روش‌های بهینه‌سازی سنتی، کمتر در راه‌حل‌های غیر بهینه گیر می‌کند. با استفاده از عملگرهای ژنتیکی مانند جهش و تقاطع که به حفظ تنوع در جمعیت کمک می‌کنند، الگوریتم ژنتیک می‌تواند از بهینه‌سازی محلی فرار کند و به جستجوی راه‌حل‌های بهتر در کل فضای جستجو ادامه دهد (Katoch et al., 2021).

جدول ۱ همچنین نشان می‌دهد که به طور کلی، ماشین‌ها در پیش‌بینی تنش‌های شوری و گرما به ترتیب بهترین و ضعیف‌ترین عملکرد را داشتند. بررسی پایگاه داده نشان می‌دهد که برای سطوح بالای دما، اختلاف غلظت قابل توجهی از ترکیبات microRNA به ازای تغییر دمای اندک ثبت گردیده است. این موضوع می‌تواند بیانگر این باشد که رقم برنج مورد مطالعه در این تحقیق (رقم فجر) در دماهای بالا رقم متحمل نبوده و حساسیت قابل توجهی از خود نشان داده است. این رفتار می‌تواند عملکرد روش‌های یادگیری ماشین را تحت تأثیر قرار دهد. به طور کلی، تنش گرمایی در طی پر شدن دانه، صرف‌نظر از کاهش عملکرد ناشی از محدودیت اسمیلات و کوتاه شدن دوره پر شدن دانه، باعث کاهش در کیفیت آن به صورت زوال کلی در ظاهر دانه، درصد بیشتر دانه‌های گچی، میزان بازیافت پایین‌تر برنج سالم، تغییر ساختمانی در آمیلوپکتین، دمای ژلاتینی بیشتر، قوام ژل، چسبندگی و انعطاف سخت‌تر دانه‌ها می‌شود (Sarkar et al., 2018; Kilasi et al., 2014). پیش‌بینی وجود تنش گرمایی در گیاهچه‌های برنج با داشتن غلظت ترکیبات microRNA و بهره‌گیری از روش‌های یادگیری ماشین می‌تواند در یک سامانه هشدار به کشاورز مورد استفاده قرار گیرد تا از کاهش کیفیت و کمیت محصول تولیدی و افزایش ضایعات و تلفات برنج جلوگیری نماید. باید توجه داشت که به دلیل محدودیت توسعه سطح زیرکشت برنج در استان‌های شمالی کشور به ویژه به دلیل محدودیت زمین، بهره‌گیری از پتانسیل سایر مناطق برنج‌خیز جهت افزایش تولید محصول ضروری است. در این راستا، استان خوزستان با دارا بودن سه میلیون هکتار اراضی قابل کشت و همچنین دارا بودن یک‌سوم آب‌های جاری کشور، می‌تواند به عنوان یکی از نقاط مستعد نقش به‌سزایی را در جهت افزایش تولید برنج و نیل به خودکفایی ایفا نماید (Lack, 2012). کشت برنج در این ناحیه می‌تواند تنش گرمایی بالایی را به محصول وارد کند. رقم پر محصول کاشته شده در این ناحیه رقم دانیال است که رقمی نیمه‌متحمل به گرما محسوب می‌شود (Gilani et al., 2022) و پیش‌بینی تنش گرمایی که در این تحقیق معرفی شده است، می‌تواند برای این رقم در استان خوزستان نیز مورد استفاده قرار گیرد.

تنش‌های شوری و خشکی با عملکرد مناسبی توسط روش ماشین بردار پشتیبان بهینه‌شده با الگوریتم ژنتیک پیش‌بینی شدند. برنج یک گیاه گلیکوفیت و حساس‌ترین گیاه به شوری در میان غلات محسوب می‌شود. تنش شوری تأثیر منفی بر نمو و عملکرد برنج دارد که با توجه به مراحل رشد، میزان شدت و مدت زمان تنش، متفاوت است. برخی از گونه‌های برنج می‌توانند شوری را تا سطح ۳ دسی‌زیمنس بر متر تحمل کنند. بر اساس گزارشات، شوری در سطح ۷ دسی‌زیمنس بر متر می‌تواند عملکرد محصول برنج را تا میزان ۵۰ درصد کاهش دهد (Taratima et al., 2022). علاوه بر تغییرات مورفولوژیکی، تنش شوری باعث تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر ممانعت از فتوسنتز، کاهش محتوای آب، تغییرات متابولیسمی، افزایش انتقال سدیم به اندام‌های هوایی و کاهش جذب پتاسیم، روی و فسفر می‌گردد (Lekklar et al., 2019). از طرف دیگر، تنش خشکی باعث ایجاد مجموعه‌ای از واکنش‌های پیچیده در گیاه برنج می‌شود که به صورت تغییرات در سطح مولکولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ظاهر می‌شوند. البته این مجموعه واکنش‌ها به شدت تنش و دوام آن، ژنوتیپ گیاه و مرحله رشد و همچنین عوامل محیطی ایجاد کننده تنش بستگی دارد (Asefpour Vakilian, 2019). تنش خشکی منجر به کاهش مقدار سبزیگی گیاه و کلروفیل می‌شود. نتایج مطالعات نشان می‌دهد در شرایط تنش خشکی و حتی تحت غلظت‌های بالای دی‌اکسیدکربن

محیط، باز هم فتوسنتز کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد دستگاه فتوسنتز صرف‌نظر از بسته شدن روزنه‌ها، تحت تأثیر قرار گرفته است. در شرایط تنش کمبود آب، روزنه‌های برگ بسته شده و متعاقب آن غلظت دی‌اکسیدکربن در بافت مزوفیل کاهش می‌یابد و منجر به کاهش عملکرد می‌گردد (Turkan et al., 2005). در نتیجه، روش پیشنهادی این تحقیق برای پیش‌بینی تنش شوری و خشکی نیز می‌تواند در سامانه هشدار به کشاورز مورد استفاده قرار گیرد تا تلفات در مزارع برنج به واسطه تنش‌های غیر زیستی محیطی به کمترین مقدار خود برسد.

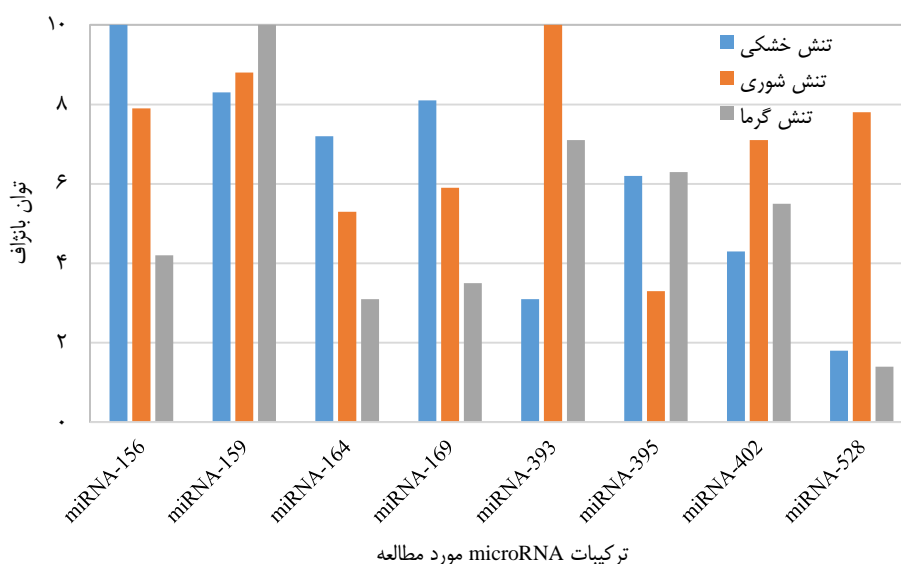
نتایج این بخش نشان می‌دهند که ترکیب روش‌های یادگیری ماشین و داده‌های به دست آمده از زیست‌حسگرهای microRNA می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در خصوص وضعیت تنش‌های محیطی در گیاه برنج در اختیار ما قرار دهند. تحقیقات پیشین نشان داده است که ترکیبات microRNA به طور اختصاصی در جهت فعالیت‌های متابولیکی در گیاهان و حیوانات عمل می‌کنند (Zen and Zhang, 2019; Yang et al., 2019; Al-Rawaf, 2019). اگرچه به نظر می‌رسد تحقیقات در خصوص اندازه‌گیری غلظت microRNA با استفاده از زیست‌حسگرها به طور عمده به مطالعات بر روی تشخیص سلامت انسان و بررسی کیفیت دارورسانی و ظهور بیماری‌هایی مانند سرطان تعلق دارد (Negahdary and Angnes, 2022; Kim et al., 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، آصف پور وکیلان (Asefpour Vakilian, 2020b) نشان داد که ماشین بردار پشتیبان با کرنل گاوسی می‌تواند با عملکرد مناسب (ضریب تبیین ۰/۹۶) برای پیش‌بینی تنش‌های محیطی در گیاهچه‌های آراییدوپسیس با داشتن غلظت ترکیبات microRNA مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیق دیگری، گزارش شده است که شبکه عصبی مصنوعی سه‌لایه می‌تواند با داشتن غلظت ترکیبات microRNA، تنش‌های محیطی گوجه‌فرنگی را با ضریب تبیین ۰/۹۴ تعیین کند (Asefpour Vakilian, 2023b). محمدی و آصف پور وکیلان (Mohammadi and Asefpour Vakilian, 2023) نیز تحقیق مشابهی بر روی خیار گلخانه‌ای انجام دادند و نشان دادند که بر خلاف ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، ترکیبات microRNA می‌توانند ورودی‌های مناسبی برای ماشین بردار پشتیبان به منظور پیش‌بینی تنش‌های محیطی باشند. اگرچه این تحقیقات برای گیاهان گلخانه‌ای و یا گیاه آراییدوپسیس که یک گیاه مدل زیستی با رفتار تقریباً مشخص در برابر تنش‌های محیطی است، گزارش شده‌اند، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که با داشتن غلظت ترکیبات microRNA و بهینه‌سازی ماشین‌هایی مانند ماشین بردار پشتیبان نیز می‌توان سطوح تنش را در ارقام داخلی محصولات مهم زراعی ایران مانند برنج تشخیص داد. از طرف دیگر، تحقیق حاضر اولین گزارش به زبان فارسی در خصوص بکارگیری غلظت ترکیبات microRNA به عنوان ورودی روش‌های یادگیری ماشین برای تعیین تنش‌های گیاهی است.

#### اهمیت ترکیبات microRNA در پیش‌بینی سطح تنش

شکل ۴ توان بانزاف هر یک از ترکیبات microRNA در پیش‌بینی هر یک از تنش‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. توان بانزاف شاخصی برای نشان دادن تأثیر هر یک از ورودی‌های مدل در تعیین دقیق مقادیر خروجی‌های مدل است. هر چه مقدار این توان برای یک ورودی بیشتر باشد، اهمیت (تأثیر) آن ورودی در تعیین خروجی بیشتر خواهد بود. مزیت انتخاب ویژگی این است که اگر نشان داده شود خروجی‌های مدل توسط تعداد کمی از ورودی‌ها قابل پیش‌بینی هستند، می‌توان ویژگی‌های کم‌اهمیت را اندازه‌گیری نکرد که به طور قابل توجهی هزینه‌های آزمایش و پیچیدگی‌های محاسباتی سامانه را کاهش می‌دهد. بر اساس شکل ۴، ترکیبات miRNA-156، miRNA-393 و miRNA-159 به ترتیب بیشترین سهم را در پیش‌بینی تنش‌های خشکی، شوری و گرما در گیاهان برنج مورد مطالعه داشتند. لازم به ذکر است که مقادیر نشان داده شده در شکل ۴ مقادیر نرمالیزه شده نسبت به بیشترین مقدار هستند. به بیان دیگر، بزرگترین توان بانزاف برای هر تنش مقدار ۱۰ در نظر گرفته شده و مابقی مقادیر به صورت نسبی نشان داده شده‌اند تا مقایسه آنها ساده‌تر باشد.

ترکیب miRNA-156 از جمله ترکیبات مهم در پاسخ گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. انواع تنش‌های غیر زیستی شناسایی شده که می‌تواند باعث تغییر بیان این ترکیب microRNA شوند، عبارتند از سمیت فلزات سنگین در برنج (Arif et al., 2019) و کلزا (Huang et al., 2010)، تنش اکسیداتیو در آراییدوپسیس (Moldovan et al., 2010)، تنش پرتو فرابنفش در گندم (Wang et al., 2013)، تنش خشکی در برنج (Zhou et al., 2010) و تنش سرما در آراییدوپسیس (Sunkar and Zhu, 2004). مشخص شده است که این ترکیب microRNA یک طبقه بسیار مهم از تنظیم‌کننده‌های زمان‌بندی و تبدیل فاز در طول رشد گیاه را هدف قرار می‌دهد که فاکتورهای رونویسی SPL نامیده می‌شوند (Stief et al., 2014). این ترکیب microRNA می‌تواند بیان ژن‌های SPL هدف خود را کاهش دهد، که به نوبه خود منجر به افزایش پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Stief et al., 2014). این

ترکیب هم در برنج و هم در آرابیدوپسیس، در اثر تنش‌های خشکی و شوری، *SPL9* را هدف قرار می‌دهد که باعث می‌شود بیان ژن‌های پایین‌دست به ویژه *PAP1* و *DFR* تنظیم شود. این موضوع باعث تغییر مسیر متابولیکی آنتوسیانین شده و منجر به افزایش سطوح تحمل گیاه به این دو تنش می‌شود (Cui et al., 2014). به‌علاوه، این ترکیب microRNA تحت تنش فلزات سنگین دوباره فاکتور رونویسی *SPL* را هدف قرار می‌دهد و بر پاسخ‌های تحمل تنش اثر می‌گذارد (Ding et al., 2011). افزایش بیان miRNA-156 در گیاهان منجر به استقرار سریع پنجه برگ‌ها (ترتیب دایره‌ای برگ‌ها حاوی برگ‌های با ارتفاع یکسان) و تأخیر نسبی در مرحله گلدهی می‌شود (Schwab et al., 2005).



شکل ۴. توان بانزاف ترکیبات microRNA مورد مطالعه در پیش‌بینی تنش‌ها

مشابه نتایج این پژوهش، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که miRNA-393 یکی از مهم‌ترین ترکیبات در پاسخ گیاه برنج در برابر تنش شوری است. به عنوان مثال، گائو و همکاران (Gao et al., 2011) نشان داده‌اند که این ترکیب microRNA با هدف قرار دادن ژن‌های LOC\_Os02g06260، LOC\_Os05g41010 و LOC\_Os05g05800، پاسخ گیاهان برنج و آرابیدوپسیس در برابر تنش شوری و محیط قلیایی را تنظیم می‌کند. هنگامی که آنها با روش‌های زیست‌فناوری باعث بیان بیشتر این ترکیب در برنج و آرابیدوپسیس شدند، گیاهان تراریخته حساسیت بیشتری به تنش شوری و قلیایی نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که miRNA-393 احتمالاً به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی پاسخ‌های گیاه به تنش‌های نمکی-قلیایی عمل می‌کند.

غلظت ترکیب miRNA-159 بیشترین امتیاز در پیش‌بینی تنش گرمایی گیاهان را داشت. این ترکیب ژن‌های میلوبلاستوز (MYB) و TCP را هدف قرار می‌دهد. تحقیقات پیشین نیز نشان داده‌اند زمانی که بیان microRNA در برنج افزایش یافت، پاسخ گیاه به تنش گرمایی بسیار شدید بود (Wang et al., 2012). از این رو، کاهش غلظت این ترکیب microRNA به طور قابل توجهی سطوح تحمل حرارتی گیاهان برنج را افزایش داده است (Wang et al., 2012).

## نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که به ازای سطوح مختلف تنش‌های خشکی، شوری و گرما، زیست‌حسگر نوری microRNA مجهز به ماشین بردار پشتیبان بهینه‌شده با روش‌های فراابتکاری می‌تواند رابطه‌ای برای پیش‌بینی سطوح تنش با داشتن غلظت چندین ترکیب microRNA پیدا کند. ماشین‌های مورد استفاده در این تحقیق (شامل شبکه عصبی مصنوعی، ماشین بردار پشتیبان و درخت تصمیم) با مقادیر پیش‌فرض برای آبرپارامترها، در بهترین حالت، ضرایب تبیین ۰/۷۹، ۰/۸۲ و ۰/۶۱ را به ترتیب برای پیش‌بینی سطوح تنش شوری، خشکی و گرما در گیاهان برنج ارائه کردند. در صورتی که ماشین بردار پشتیبان با آبرپارامترهای بهینه‌شده با الگوریتم ژنتیک توانست به ترتیب با ضرایب تبیین ۰/۹۴، ۰/۹۱ و ۰/۸۶ سطح تنش شوری، خشکی و گرمای وارده به گیاهان برنج را پیش‌بینی کند. این موضوع نشان می‌دهد که ویژگی‌های پیشنهادی استخراج شده در این مطالعه، به عنوان جایگزین بسیار مناسبی برای ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه،

می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد بیماری‌های غیر زیستی گیاهی در مراحل اولیه به کشاورزان، مهندسين کشاورزی و گیاه‌پزشکان ارائه نمایند. 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.

از طرف دیگر، تمامی هشت ترکیب microRNA مورد استفاده به عنوان ورودی ماشین اهمیت (تأثیر) یکسانی در پیش‌بینی تنش‌های مورد مطالعه نداشتند. ترکیبات miRNA-156، miRNA-393، و miRNA-159 به ترتیب بیشترین سهم را در پیش‌بینی تنش‌های خشکی، شوری و گرما در گیاه برنج داشتند که این موضوع نشان می‌دهد اندازه‌گیری این ترکیبات برای پیش‌بینی کارآمد سطوح تنش در گیاهان برنج کفایت می‌کند.

به عنوان یک حسگر مبتنی بر تجمع نانوذرات طلا، در صورت استفاده از یک دستگاه طیف‌سنجی قابل حمل، روش پیشنهادی توسط کشاورزان و متخصصان کشاورزی نه تنها برای برنج، بلکه برای دیگر محصولات زراعی نیز قابل استفاده است. این حسگر را می‌توان به یک رایانه قابل حمل متصل کرد که الگوریتم یادگیری ماشین در آن اجرا می‌شود. در تحقیقات آتی می‌توان روش‌های اینترنت اشیا<sup>۱</sup> برای انتقال بی‌سیم داده‌های طیفی زیست‌حسگر به یک رایانه میزبان<sup>۲</sup> را برای افزایش عملکرد روش پیشنهادی برای کاربردهای واقعی و عملی پیاده‌سازی کرد. در این شرایط، واحد یادگیری ماشین بر روی دستگاه زیست‌حسگر قرار نخواهد گرفت که می‌تواند هزینه تمام شده آن را به طور قابل توجهی کاهش دهد. در عوض، داده‌های زیست‌حسگر از طریق ماژول‌های GPRS و یا تلفن همراه هوشمند کشاورز به یک رایانه میزبان که ممکن است هزاران کیلومتر دورتر از زیست‌حسگر باشد، منتقل شده و نتیجه تحلیل داده‌ها پس از پردازش بر روی رایانه میزبان، بر روی صفحه تلفن همراه هوشمند کشاورز ظاهر شود تا او از وضعیت سلامتی محصولات خود مطلع گردد.

اگرچه نباید فراموش کرد که 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 پیش‌تر با شرایط دیگر گیاه به ماشین آموزش داده شده بوده است، با خطای زیادی روبرو خواهد شد. رفع این محدودیت، با توسعه پایگاه‌های عظیم داده بر روی رایانه‌های میزبان که بتوانند شرایط مختلف رشد و بیماری‌های گیاهی را پوشش دهند، امکان‌پذیر خواهد بود. این موضوع به تحقیقات وسیع در آینده نیازمند است.

یک محدودیت دیگر، لزوم وجود یک دستگاه طیف‌سنجی در ساختمان زیست‌حسگرهای نوری است که قیمت تمام‌شده این حسگرها را افزایش می‌دهد. از آنجا که تجمع نانوذرات طلا (که اساس کار این تحقیق برای اندازه‌گیری غلظت ترکیبات microRNA است) با اندازه‌گیری جذب طیفی نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۰ و ۷۵۰ نانومتر تعیین می‌شود، می‌توان به جای استفاده از دستگاه‌های طیف‌سنجی قابل حمل که جذب طیفی در ناحیه وسیعی را اندازه‌گیری می‌کنند، از یک سامانه گیرنده-فرستنده مبتنی بر دیود نورافشان<sup>۳</sup> (LED) بهره گرفت که میزان جذب طیفی را تنها در این دو طول موج اندازه‌گیری می‌کند. این حوزه تحقیقاتی نیز نیاز به پژوهش‌های فراوان بین‌رشته‌ای در آینده دارد.

## REFERENCES

- Al-Rawaf, H. A. (2019). Circulating microRNAs and adipokines as markers of metabolic syndrome in adolescents with obesity. *Clinical Nutrition*, 38(5), 2231–2238.
- Aliferis, C., & Simon, G. (2024). Overfitting, underfitting and general model overconfidence and under-performance pitfalls and best practices in machine learning and AI. In *Artificial intelligence and machine learning in health care and medical sciences: Best practices and pitfalls*. edited by Simon, G., Aliferis, C. Cham: Springer International Publishing. 477–524.
- Arif, N., Sharma, N. C., Yadav, V., Ramawat, N., Dubey, N. K., Tripathi, D. K., Chahan, D. K., & Sahi, S.

<sup>۱</sup> Internet of things

<sup>۲</sup> Host

<sup>۳</sup> Light-emitting diode



- (2019). Understanding heavy metal stress in a rice crop: toxicity, tolerance mechanisms, and amelioration strategies. *Journal of Plant Biology*, 62, 239–253.
- Asefpour Vakilian, K. A. (2019). Gold nanoparticles-based biosensor can detect drought stress in tomato by ultrasensitive and specific determination of miRNAs. *Plant Physiology and Biochemistry*, 145, 195–204.
- 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. (2022). Optimization methods can increase the durability of smart electrochemical biosensors. In *8th Iranian Conference on Signal Processing and Intelligent Systems*. Behshahr, Iran. December 28, 2022.
- Asefpour Vakilian, K. (2023a). A smart electrochemical biosensor for arsenic detection in water. In *13th International Conference on Computer and Knowledge Engineering*. Mashhad, Iran. November 27, 2023.
- Asefpour Vakilian, K. (2023b). Emerging smart biosensors for the specific and ultrasensitive detection of plant abiotic stresses. In *International Congress on Agricultural Mechanization and Energy in Agriculture*. Antalya, Turkey. October 29, 2023.
- Bajpai, P., & Kumar, M. (2010). Genetic algorithm—an approach to solve global optimization problems. *Indian Journal of Computer Science and Engineering*, 1(3), 199–206.
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10, 16975.
- Behera, L. M., & Hembram, P. (2021). Advances on plant salinity stress responses in the post-genomic era: a review. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 24(2), 117–126.
- Bzdok, D., Krzywinski, M., & Altman, N. (2017). Points of Significance: Machine learning: A primer. *Nature Methods*, 14(12), 1119–1120.
- Chandar, A. G., Sivasankari, K., Lakshmi, S. L., Sugumaran, S., Kannadhasan, S., & Balakumar, S. (2024). An innovative smart agriculture system utilizing a deep neural network and embedded system to enhance crop yield. *Multidisciplinary Science Journal*, 6(5), 1–11.
- Chandra, S., & Roychoudhury, A. (2020). Penconazole, paclobutrazol, and triacantanol in overcoming environmental stress in plants. In *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives*. edited by Roychoudhury, A., & Tripathi, D. K. Hoboken: John Wiley & Sons. 510–34.
- Chen, S. J., Huang, Y. F., Huang, C. C., Lee, K. H., Lin, Z. H., & Chang, H. T. (2008). Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(11), 1749–1753.
- 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.
- Cui, L. G., Shan, J. X., Shi, M., Gao, J. P., Lin, H. X. (2014). The miR156 SPL 9 DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*, 80, 1108–1117.
- Das, B., Sen, A., Roy, S., Banerjee, O., & Bhattacharya, S. (2021). miRNAs: Tiny super-soldiers shaping the life of rice plants for facing “stress”-ful times. *Plant Gene*, 26, 100281.
- 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.
- 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.
- Esmaili, M., Aliniaiefard, S., Mashal, M., Vakilian, K. A., Ghorbanzadeh, P., Azadegan, B., Seif, M., & Didaran, F. (2021). Assessment of adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS) to predict production and water productivity of lettuce in response to different light intensities and CO<sub>2</sub> concentrations. *Agricultural Water Management*, 258, 107201.
- Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., Cai, H., Ji, W., Chen, Q., & Zhu, Y. (2011). *osa*-MIR393: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*, 38, 237–242.
- Gao, Z., Ma, C., Zheng, C., Yao, Y., & Du, Y. (2022). Advances in the regulation of plant salt-stress tolerance



- by miRNA. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5041–5055.
- Ghosh, S., Adhikari, S., Adhikari, A., & Hossain, Z. (2022). Contribution of plant miRNAome studies towards understanding heavy metal stress responses: current status and future perspectives. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104705.
- Gilani, A., Behbahani, L., Asl, J. H., & Azizi, A. (2022). Effect of parboil on quality and quantity of characteristics of three local rice cultivars of Khuzestan province. *Journal of Innovation in Food Science & Technology*, 13(4), 98.
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., Chao, D. Y., Li, J., Wang, P. Y., Qin, F., Li, J., Ding, Y., Shi, Y., Wang, Y., Yang, Y., Guo, Y., & Zhu, J. K. (2020). Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63, 635–674.
- Guy, C. (1999). Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 231–242.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.
- Hakimian, F., Ghourchian, H., Sadat Hashemi, A., Arastoo, M. R., & Rad, M. B. (2018). Ultrasensitive optical biosensor for detection of miRNA-155 using positively charged Au nanoparticles. *Scientific reports*, 8(1), 2943.
- Hancer, E., Xue, B., & Zhang, M. (2018). Differential evolution for filter feature selection based on information theory and feature ranking. *Knowledge-Based Systems*, 140, 103–119.
- Hashemi, A., Asefpour Vakilian, K., Khazaei, J., & Massah, J. (2014). An artificial neural network modeling for force control system of a robotic pruning machine. *Journal of Information and Organizational Sciences*, 38(1), 35–41.
- Huang, S. Q., Xiang, A. L., Che, L. L., Chen, S., Li, H., Song, J. B., & Yang, Z. M. (2010). A set of miRNAs from Brassica napus in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnology Journal*, 8(8), 887–899.
- Javidan, S. M., Banakar, A., Asefpour Vakilian, K., & Ampatzidis, Y. (2022) A feature selection method using slime mould optimization algorithm in order to diagnose plant leaf diseases. In *8th Iranian Conference on Signal Processing and Intelligent Systems*. Behshahr, Iran. December 28, 2022.
- Javidan, S. M., Banakar, A., Vakilian, K. A., & Ampatzidis, Y. (2023). Diagnosis of grape leaf diseases using automatic K-means clustering and machine learning. *Smart Agricultural Technology*, 3, 100081.
- Ji, X., Song, X., Li, J., Bai, Y., Yang, W., & Peng, X. (2007). Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45), 13939–13948.
- Johnson, B. N., & Mutharasan, R. (2014). Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges. *Analyst*, 139(7), 1576–1588.
- Katoch, S., Chauhan, S. S., & Kumar, V. (2021). A review on genetic algorithm: past, present, and future. *Multimedia Tools and Applications*, 80, 8091–8126.
- Kilasi, N. L., Singh, J., Vallejos, C. E., Ye, C., Jagadish, S. K., Kusolwa, P., & Rathinasabapathi, B. (2018). Heat stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.): identification of quantitative trait loci and candidate genes for seedling growth under heat stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1578.
- 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.
- Kumar, S., Sharma, N., Sopory, S. K., & Sanan-Mishra, N. (2024). miRNAs and genes as molecular regulators of rice grain morphology and yield. *Plant Physiology and Biochemistry*, 207, 108363.
- Lack, S. (2012). The effects of seed number per hill on grain yield and source-sink relations of three rice cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, 7(1), 43–50.
- Lekklar, C., Suriya-Arunroj, D., Pongpanich, M., Comai, L., Kositsup, B., Chadchawan, S., & Buaboocha, T. (2019). Comparative genomic analysis of rice with contrasting photosynthesis and grain production under salt stress. *Genes*, 10(8), 562.
- Li, J., Cheng, K., Wang, S., Morstatter, F., Trevino, R. P., Tang, J., & Liu, H. (2017). Feature selection: A data perspective. *ACM Computing Surveys*, 50(6), 1–45.
- Li, C., Nong, W., Zhao, S., Lin, X., Xie, Y., Cheung, M. Y., Xiao, Z., Wong, A. Y. P., Chan, T. F., Hui, J. H. L., & Lam, H. M. (2022). Differential microRNA expression, microRNA arm switching, and microRNA: long noncoding RNA interaction in response to salinity stress in soybean. *BMC Genomics*, 23(1), 65.
- Li, M., & Yu, B. (2021). Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA biology*, 18(12), 2087–2096.
- 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.
- Liu, Z., & Xu, H. (2014). Kernel parameter selection for support vector machine classification. *Journal of Algorithms and Computational Technology*, 8(2), 163–177.
- Luo, P., Di, D., Wu, L., Yang, J., Lu, Y., & Shi, W. (2022). MicroRNAs are involved in regulating plant development and stress response through fine-tuning of TIR1/AFB-dependent auxin signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 510.
- 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.
- Massah, J., & Asefpour Vakilian, K. (2019). An intelligent portable biosensor for fast and accurate nitrate determination using cyclic voltammetry. *Biosystems Engineering*, 177, 49-58.
- Meher, P. K., Begam, S., Sahu, T. K., Gupta, A., Kumar, A., Kumar, U., Rao, A. R., Singh, K. P., & Dhankher, O. P. (2022). ASRmiRNA: abiotic stress-responsive miRNA prediction in plants by using machine learning algorithms with pseudo K-tuple nucleotide compositional features. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1612.
- Mishra, S., Spaccarotella, K., Gido, J., Samanta, I., & Chowdhary, G. (2023). Effects of heat stress on plant-nutrient relations: An update on nutrient uptake, transport, and assimilation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15670.
- 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.
- Moldovan, D., Spriggs, A., Yang, J., Pogson, B. J., Dennis, E. S., & Wilson, I. W. (2010). Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 165–177.
- 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.
- Noman, A., & Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 10068–10082.
- Pannakkong, W., Thiwa-Anont, K., Singthong, K., Parthanadee, P., & Buddhakulsomsiri, J. (2022). Hyperparameter tuning of machine learning algorithms using response surface methodology: A case study of ANN, SVM, and DBN. *Mathematical Problems in Engineering*, 2022, 8513719.
- Patel, P., Yadav, K., Ganapathi, T. R., & Penna, S. (2019). Plant miRNAome: Cross talk in abiotic stressful times. In: *Genetic enhancement of crops for tolerance to abiotic stress: Mechanisms and approaches*. edited by Rajpal, V. R., Sehgal, D., Kumar, A., Raina, S. N. Cham: Springer. 25–52.
- Pradhan, U. K., Meher, P. K., Naha, S., Rao, A. R., Kumar, U., Pal, S., & Gupta, A. (2023). ASmiR: a machine learning framework for prediction of abiotic stress-specific miRNAs in plants. *Functional & Integrative Genomics*, 23(2), 92.
- Rudin, C., & Radin, J. (2019). Why are we using black box models in AI when we don't need to? A lesson from an explainable AI competition. *Harvard Data Science Review*, 1(2), 1–10.
- Sarkar, N. K., Kim, Y. K., & Grover, A. (2014). Coexpression network analysis associated with call of rice seedlings for encountering heat stress. *Plant Molecular Biology*, 84, 125–143.
- Sarlaki, E., Paghaleh, A. S., Kianmehr, M. H., & Asefpour Vakilian, K. (2021). Valorization of lignite wastes into humic acids: Process optimization, energy efficiency and structural features analysis. *Renewable Energy*, 163, 105–122.
- Schratz, P., Muenchow, J., Iturritxa, E., Richter, J., & Brenning, A. (2019). Hyperparameter tuning and performance assessment of statistical and machine-learning algorithms using spatial data. *Ecological Modelling*, 406, 109–120.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517–527.
- Song, Y. Y., & Ying, L. U. (2015). Decision tree methods: applications for classification and prediction. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 27(2), 130.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., & Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*,



26(4), 1792–1807.

- Sun, X., Liu, Y., Li, J., Zhu, J., Chen, H., & Liu, X. (2012). Feature evaluation and selection with cooperative game theory. *Pattern recognition*, 45(8), 2992–3002.
- Sun, J., Zhong, G., Huang, K., & Dong, J. (2018). Banzhaf random forests: Cooperative game theory based random forests with consistency. *Neural Networks*, 106, 20–29.
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2001–2019.
- Taratima, W., Chomarsa, T., & Maneerattanarungroj, P. (2022). Salinity stress response of rice (*Oryza sativa* L. cv. Luem Pua) calli and seedlings. *Scientifica*, 2022, 5616683.
- Tran, H. V., & Piro, B. (2021). Recent trends in application of nanomaterials for the development of electrochemical microRNA biosensors. *Microchimica Acta*, 188(4), 128.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168, 223–231.
- 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.
- Varkonyi-Gasic, E., Gould, N., Sandanayaka, M., Sutherland, P., & MacDiarmid, R. M. (2010). Characterisation of miRNAs from apple (*Malus domestica* 'Royal Gala') vascular tissue and phloem sap. *BMC Plant Biology*, 10, 159.
- Venkatesh, B., & Anuradha, J. (2019). A review of feature selection and its methods. *Cybernetics and Information Technologies*, 19(1), 3–26.
- Wang, B., Sun, Y. F., Song, N., Wang, X. J., Feng, H., Huang, L. L., & Kang, Z. S. (2013). Identification of UV-B-induced microRNAs in wheat. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 4213–4221.
- Wang, Y., Sun, F., Cao, H., Peng, H., Ni, Z., Sun, Q., & Yao, Y. (2012). TamiR159 directed wheat TaGAMYB cleavage and its involvement in another development and heat response. *PLoS One*, 7, e48445.
- Yang, B., Tang, J., Yu, Z., Khare, T., Srivastav, A., Datir, S., & Kumar, V. (2019). Light stress responses and prospects for engineering light stress tolerance in crop plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 1489–1506.
- Yin, J. Q., Zhao, R. C., & Morris, K. V. (2008). Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 70–76.
- Yoshida, S., Forno, D. A., & Cock, J. H. (1971). *Laboratory manual for physiological studies of rice*. Philippines: Los Baños Publishing.
- Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Medicinal Research Reviews*, 32(2), 326–348.
- Zhang, F., Yang, J., Zhang, N., Wu, J., & Si, H. (2022). Roles of microRNAs in abiotic stress response and characteristics regulation of plant. *Frontiers in Plant Science*, 13, 919243.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4157–4168.

## Detecting abiotic stresses in rice plants using a smart optical biosensor based on gold nanoparticles

### EXTENDED ABSTRACT

#### Introduction

MicroRNAs are small non-coding molecules that are found in the cells of living organisms, affecting gene expression and, thus, proteins involved in physiological and biochemical processes. These compounds determine the response of plants toward biotic and abiotic stresses. Therefore, it seems that by measuring the concentration of such compounds, it is possible to predict the severity of the stress applied to the rice plants, which can significantly reduce the yield and increase its losses. The objectives of this study include using a biosensor based on the gold nanoparticle aggregation to collect data on microRNA concentrations in rice plants under stress, using machine learning algorithms for the specific detection of plant stress, and identifying the contribution of each microRNA to the efficient detection of stresses based on feature selection methods.

#### Material and methods

Rice seedlings were subjected to salinity (at six levels), drought (at six levels), and heat (at four levels) for seven days. The concentrations of miRNA-156, miRNA-159, miRNA-164, miRNA-169, miRNA-393, miRNA-395, miRNA402, and miRNA-528 were measured from the root and stem samples collected from the plants under stress. Due to the high number of samples and measurable compounds in this study, it was not possible to use time-consuming methods such as polymerase chain reaction. For this purpose, an optical biosensor based on probe-target hybridization was used. In this biosensor, the mixture of probe/gold nanoparticles capped with citrate and microRNA/nanoparticles capped with polyethyleneimine led to the aggregation of nanoparticles and a change in the spectroscopic characteristics of the sample. The artificial neural network, support vector machine, and decision tree were used as machine learning models to train the data. The genetic algorithm was used to optimize the hyperparameters of the methods.

#### Results and discussion

The most suitable results for predicting the level of stresses applied to rice seedlings were obtained by the support vector machine optimized by genetic algorithm, which was able to predict the level of salinity, drought, and heat with coefficients of determination equal to 0.94, 0.91, and 0.86, respectively. These results show that, as expected, the concentration of microRNAs changed toward various levels of stress. The genetic algorithm significantly increased the performance of the machines for efficient prediction of all three types of stresses. In general, the machines performed best and worst in predicting salinity and heat stresses, respectively. Based on the cooperative game theory, the Banzhaf power index was considered to determine the effects of the concentration of each microRNA in predicting stresses. Based on the values obtained for the Banzhaf power index, miRNA-156, miRNA-393, and miRNA-159 exerted the greatest contribution in predicting drought, salinity, and heat stress in the studied rice plants, respectively.

#### Conclusion

The results of this research showed that for various levels of drought, salinity, and heat stresses, a microRNA optical biosensor equipped with the support vector machine optimized with meta-heuristic methods can find a relationship between the stress levels and the concentration of microRNAs. In this situation, it seems that by extracting microRNA data with the help of a portable spectroscopic device, it is no longer necessary to extract the morphological and physiological characteristics of the plant, which is usually time-consuming and requires the transfer of samples to well-equipped laboratories, to provide a reliable understanding of plant stress status. Furthermore, the proposed method has the ability to be implemented in Internet of Things (IoT) systems to move toward digital agriculture.