

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of biochemical and morphophysiological changes of some pepper cultivars infected with *Potato Virus Y* (PVY)

Samane Vatani¹, Saeed Nasrollanejad^{1*}, Abdolhosein Taheri¹, Farzad Ali Ramaji¹, Sharbano Vakili², Leila Fahmideh³

¹Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²Plant Protection Research Department, Agriculture and Natural Resources Research and Education Center of Golestan Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran

³Department of Plant Breeding and Biotechnology, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Correspondence

Saeed Nasrollanejad

Email: snasrollanejad@gau.ac.ir

How to cite

Vatani, S., Nasrollanejad, S., Taheri, A., Ali Ramaji, F., Vakili, Sh., & Fahmideh, L. (2024). Assessment of biochemical and morphophysiological changes of some pepper cultivars infected with *Potato Virus Y* (PVY). *Crop Biotechnology*, 13(46), 1-18.

ABSTRACT

Potato virus Y (PVY) is one of the most important and widely distributed viral diseases of Solanaceae family and the use of resistant cultivars is the most effective control measure of this disease. In this research, the response of seven pepper cultivars was investigated in two conditions, healthy control and infection with PVY. This experiment was performed as a factorial in a completely randomized design with four replications. The results showed that under the conditions of viral infection, the growth indices including: height of the plant (31.84%), shoot fresh and dry weight (46.55 and 46.61%), plant fresh and dry weight (50.16 and 50.09%), root fresh and dry weight (54.76 and 51.93%) of all seven cultivars decreased compared to the control conditions. While the amount of chlorophyll a, b and total chlorophyll, carotenoid, the content of phenol and flavonoid and diseases severity of all studied cultivars increased compared to the control conditions. To confirm the infection of treated plants, PVY virus identification was performed by direct ELISA test with IgG-PVY antiserum and RT-PCR test using specific primers PVY-8687F and PVY-9295R. The results of the RT-PCR test showed the amplification of a fragment of 327 base pairs, which indicates the confirmation of the ELISA test and it was consistent with the sequence determination results in the NCBI database (Accession number–KR909091.1) that was previously registered for this isolate. In general, the Cauba cultivar has shown a better reaction in the face of infection with PVY virus. So, this cultivar can be suggested for future studies of pepper cultivars.

KEYWORDS

Pepper cultivars, Disease severity, Photosynthetic pigments, Growth traits, Phenol and flavonoid content

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تغییرات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیک برخی ارقام فلفل آلوده به ویروس وای سیب زمینی (PVY)

سمانه وطنی^۱، سعید نصرالله نژاد^{۱*}، عبدالحسین طاهری^۱، فرزاد علی رمجی^۱، شهربانو وکیلی^۲، لیلا فهمیده^۳

چکیده

ویروس وای سیب زمینی (PVY) یکی از مهمترین و شایعترین بیماری‌های ویروسی خانواده Solanaceae است و مؤثرترین روش مبارزه با آن استفاده از ارقام مقاوم است. در این پژوهش واکنش هفت رقم فلفل به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در دو تیمار شاهد و آلودگی با ویروس PVY بررسی شد. نتایج تیمارهای مایه زنی نشان دادند شاخص‌های رشدی شامل ارتفاع بوته (۳۱/۸۴ درصد)، وزن تر و خشک اندام هوایی (۴۶/۵۵ و ۴۶/۶۱ درصد)، وزن تر و خشک کل بوته (۵۰/۱۶ و ۵۰/۰۹ درصد)، وزن تر و خشک ریشه (۵۱/۹۳ و ۵۴/۷۶ درصد) در ارقام مایه زنی شده به PVY نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد، در حالی که میزان کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، محتوی فنول، فلاونوئید و شدت آلودگی تمامی ارقام مورد مطالعه نسب به شاهد افزایش نشان داد. جهت تأیید آلودگی گیاهان مایه زنی شده، شناسایی ویروس PVY با آزمون الایزای مستقیم و با آنتی سرم PVY-IgG و آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVY-8687F و PVY-9295R انجام شد. نتایج آزمون RT-PCR نشان‌دهنده تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۳۲۷ جفت باز بود که بیانگر تأیید آزمون الایزا بود و با نتایج تعیین توالی در پایگاه داده NCBI (Accession number-KR909091.1) که قبلاً برای این جدایه ثبت شده بود مطابقت داشت. در مجموع رقم کائوبا عکس العمل بهتری در مواجهه با آلودگی ویروسی نشان داد، لذا می‌توان این رقم را برای مطالعات آتی به‌نژادی ارقام فلفل پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی

ارقام فلفل، شدت آلودگی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات رشدی، محتوی فنل و فلاونوئید.

^۱گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. ^۲بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران. ^۳گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

نویسنده مسئول:

سعید نصرالله نژاد

رایانامه: snasrollanejad@gu.ac.ir

استناد به این مقاله:

وطنی، سمانه؛ نصرالله نژاد، سعید؛ طاهری، عبدالحسین؛ علی رمجی، فرزاد؛ وکیلی، شهربانو و فهمیده، لیلا (۱۴۰۳). بررسی تغییرات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیک برخی ارقام فلفل آلوده به ویروس وای سیب زمینی (PVY). فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴(۴)، ۱-۱۸.

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

یکی از مهمترین عوامل کاهش رشد و عملکرد گیاهان در کنار تنش‌های غیرزنده، تنش‌های زیستی است که توسط میکروارگانیسم‌هایی همچون قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و علف‌های هرز ایجاد می‌شود (Verma *et al.*, 2013) و هر ساله خسارت‌های زیان‌باری بر رشد رویشی و زایشی محصولات در جهان وارد می‌نماید (Gull *et al.*, 2019). تنش‌های زنده و غیر زنده از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر تولید محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند. همچنین موجب تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در گیاهان می‌گردد (Umar *et al.*, 2019; Kiani *et al.*, 2020). این نوع تنش سبب کاهش رشد قسمت‌های مختلف گیاه اعم از ریشه‌ها و اندام‌های هوایی (Mofunanya *et al.*, 2015)، کاهش سطح برگ (Pazarlar *et al.*, 2013)، ارتفاع، وزن تر و خشک گیاه (Shamli *et al.*, 2017)، کاهش فتوسنتز و سبزیگی گیاه، (Saadati *et al.*, 1400) تغییر در سنتز پروتئین‌ها (Abdullahi *et al.*, 2014) و غیره می‌شود. کلروفیل برگ یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان‌دهنده تنش‌های محیطی وارده بر گیاه بوده به طوری که میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش کاهش یافته و باعث تغییر و کاهش جذب نور توسط گیاه می‌شود (Haghpanah *et al.*, 2019).

ویروس‌های گیاهی یکی از عوامل ایجاد کننده تنش‌های زیستی می‌باشند. ویروس‌ها انگل اجباری بوده و قادرند بیماری‌های شدیدی در گیاهان ایجاد و در نتیجه سبب کاهش بسیاری از محصولات مهم شوند (Saadati *et al.*, 1400). آلودگی‌های ویروسی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی درون سلول گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند و اغلب سبب ظهور علائمی مانند کوتولگی، چروکیدگی، ابلقی شدن برگ‌ها، پژمردگی، لکه‌های سبز و بافت مردگی، ریزش برگ و میوه و موزائیکی شدن می‌شوند (Mishra *et al.*, 2020). یکی از بیمارگرهای ویروسی مهم، ویروس وای سیب زمینی (Potato Virus Y, PVY) است که ویروسی میله‌ای شکل، خمش پذیر با ژنوم RNA تک رشته‌ای (ssRNA) با قطبیت مثبت به طول حدوداً ۹/۷ کیلو باز متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* است که برای ۱۱ پروتئین عملکردی را رمزگذاری می‌کند (Baebler *et al.*, 2020). جدایه‌های مختلف PVY را براساس نوع علائمی که در میزبان‌های مختلف ایجاد می‌کنند، به هفت گروه نژادی تقسیم‌بندی شده‌اند و سه گروه نژادی مهم آن

شامل PVY^O ، PVY^N و PVY^C هستند که گروه‌های PVY^C و PVY^O هر دو در گیاه توتون، علائم موزائیک مشابه تولید می‌کنند و در سیب‌زمینی، نژاد PVY^C علائم موزائیک ملایم ایجاد می‌کند و اما نژاد PVY^O علائم شدیدتری مانند بافت مردگی، موزائیک خشن برگی و عقب ماندگی رشدی ایجاد می‌کند، در حالی که گروه نژادی PVY^N موجب بروز بافت مردگی رگبرگی در توتون و موزائیک ملایم در اغلب وارپته‌های سیب‌زمینی می‌شوند (Glais *et al.*, 2017). PVY به شدت بر تولید سیب‌زمینی از نظر عملکرد و کیفیت محصول تأثیر می‌گذارد که در صورت آلودگی ثانویه می‌تواند تا ۸۵ درصد کاهش عملکرد داشته باشد (Kežar *et al.*, 2019). این ویروس همچنین به سایر محصولات زراعی مهم از خانواده Solanaceae مانند تنباکو، فلفل و گوجه فرنگی و همچنین به گیاهانی غیر از خانواده بادمجانیان از جمله: عروسک پشت پرده و علفهای هرزی مانند تاجریزی حمله و آن‌ها را آلوده می‌کند (Kreuz *et al.*, 2020). یکی از میزبان‌های مهم این ویروس گیاه فلفل است که آلودگی به آن موجب بروز علائم موزائیک، پیسک و بدشکلی در برگ‌ها و میوه‌ها و جلوگیری از رشد مطلوب گیاه می‌شود و در صورت همراه بودن سایر آلودگی‌های ویروسی با این ویروس، گیاه فلفل دچار نکرور و کوتولگی می‌گردد (Aghmolaei *et al.*, 2015). گیاه فلفل از جمله سبزی‌های پرمصرف متعلق به Solanaceae است که دارای حدود ۳۰ گونه گیاهی می‌باشد که شش گونه آن از قبیل *Capsicum annuum* L.، *Capsicum baccatum* L.، *Capsicum frutescens* L.، *Capsicum chinense* Jacq. و *Capsicum praetermissum* Heiser & P.G.Sm و *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. به صورت عمده در جهان کشت و کار می‌شوند (Zamljen *et al.*, 2020). یکی از گونه‌ای پرمصرف این جنس فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum*) است که بومی مناطق جنوب آمریکای شمالی و شمال آمریکای جنوبی است (Rodríguez-Calzada *et al.*, 2019) و عمدتاً به رنگ‌های سبز، قرمز، زرد و نارنجی یافت می‌شود و در ایران نیز کشت می‌شود. این محصول نه تنها به دلیل ارزش اقتصادی، بلکه به دلیل دارا بودن رنگ‌های طبیعی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ویتامین A، C و E بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Fan *et al.*, 2020).

در مطالعه‌ای تأثیر آلودگی ویروسی ناشی از ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) را بر وارپته‌های

میانگین دمای شبانه‌روزی 28 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

انتقال ویروس: به منظور مایه‌زنی ارقام کاشته شده یک جدایه ویروس وای سیب‌زمینی که قبلاً از مزارع استان گلستان جداسازی و مورد خالص‌سازی بیولوژیک قرار گرفته بود و همچنین در شرایط گلخانه بر روی توتون رقم Burley 21 مورد تکثیر و نگهداری قرار گرفته بود و در بانک ژن NCBI نیز ثبت شده بود جهت مایه زنی ارقام فلفل مورد استفاده قرار گرفت. مایه تلقیح ویروس برای مایه‌زنی و انتقال عصاره از برگ‌های جوان که علایم آلودگی ویروسی را خوب نشان دادند، انتخاب شدند. پس از انتخاب بافت‌های آلوده مناسب و همگن‌سازی آنها با استفاده از هاون چینی سرد، مایه ویروس با غلظت بالا ($OD=1.45$) تهیه گردید (Abdullahi et al., 2014).

تهیه بافر مایه زنی: ابتدا محلول بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با $pH=7/5$ جهت تهیه بافر مایه زنی ویروس تهیه شد سپس این محلول تا زمان عصاره‌گیری و انتقال به گیاه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (Jafarpour, 1992). جهت عصاره‌گیری و تهیه مایه ویروس یک گرم از برگ آلوده به ویروس در هاونی که قبلاً سرد شده بود، منتقل و محلول بافر فسفات پتاسیم سرد با نسبت یک به ده اضافه شد و پس از تهیه عصاره، با استفاده از پارچه ممل به داخل ظرفی مناسب صاف گردید و سپس تا موقع مصرف در داخل ظرف یخ قرار گرفت.

مایه‌زنی گیاهان با PVY: در مرحله چهارم برگ‌های گیاهچه‌های فلفل، مایه‌زنی با PVY^0 انجام شد. جهت اعمال تیمار ویروس، برگ‌های ارقام مورد بررسی با استفاده از پودر کاربوراندوم زخم و سپس به ویروس آلوده شدند.

صفات مورد بررسی: تقریباً یک ماه بعد از اعمال تیمار ویروس، نمونه‌برداری از هر تیمار انجام شد و صفاتی مانند شاخصه‌های رشدی و همچنین اندازه‌گیری محتوی فنول، فلاونوئید و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ و همچنین شدت آلودگی ویروسی در هر دو شرایط شاهد و آلودگی با ویروس اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی: اندازه‌گیری ارتفاع بوته با استفاده از خط کش (برحسب سانتی متر) انجام شد. برای اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک، ابتدا اندام هوایی هر گیاه از ریشه‌ها جدا، وزن تر ریشه و اندام هوایی بر حسب گرم و با ترازو با

Kumsal و Ergenekon از طریق اندازه‌گیری برخی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بررسی کردند و نتایج نشان داد که آلودگی با ویروس می‌تواند سبب کاهش صفاتی از قبیل محتوی نسبی آب برگ، طول ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه، ارتفاع گیاه و افزایش محتوی پروتئین ارقام مورد بررسی فلفل شود (Pazarlar et al., 2013). همچنین در پژوهشی وضعیت آلودگی مزارع توتون با ویروس PVY در مناطق مختلف استان گلستان مورد مطالعه قرار گرفت و آلودگی مزارع توتون استان گلستان با این ویروس قبلاً گزارش شده است (Sharifi-nezamabad et al., 2019). بنابراین با توجه به مطالب فوق این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه تأثیر ویروس وای سیب‌زمینی بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی هفت رقم فلفل در شرایط کشت گلخانه‌ای انجام شد.

روش‌شناسی پژوهش

در این تحقیق مایه زنی هفت رقم فلفل شامل: آوانته، گاسپیل، بنینو، تارانتو، اینسپرشین، نیروین و کائوبا با ویروس وای سیب زمینی PVY^0 (Accession number-KR909091.1) در شرایط گلخانه انجام شد و در ادامه اثر مایه‌زنی این ویروس بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه فلفل، در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۲ بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل ارقام فلفل (هفت رقم) و سطوح مختلف تنش زیستی (دو سطح عدم آلودگی (شاهد) و آلودگی توسط مایه‌زنی با جدایه ویروس وای سیب‌زمینی بود. جهت تأیید آلودگی، ویروس PVY^0 با آزمون الایزای مستقیم و با آنتی سرم $IgG-PVY^0$ و آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVY^0 -867F و PVY^0 -9295R (نتایج تعیین توالی برای این جدایه قبلاً در پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی: Accession number-KR909091.1 ثبت شده بود) شناسایی شد.

تهیه بذور و روش کاشت: بذورهای ارقام رایج کشت‌های گلخانه‌ای کشور که تمامی آنها هیبرید و وارداتی هستند از مرکز بانک بذر مرکز تحقیقات و آموزش گرگان تهیه شد. بذر ارقام مذکور شامل آوانته، گاسپیل، بنینو، تارانتو، اینسپرشین، نیروین و کائوبا در گلدان‌های حاوی خاک استریل در شرایط کنترل شده و به دور از منابع آلودگی کاشته و پس از کشت در گلخانه با

اندازه‌گیری رنگی‌های فتوستنتزی. برای سنجش میزان کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها از روش Dere *et al.* (1998) استفاده شد. ابتدا ۰/۲ گرم برگ با ۱۰ میلی لیتر متانول ۹۹ درصد در هاون چینی سائیده شده و سپس محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و سپس جذب محلول رویی جهت تعیین میزان کلروفیل‌ها و کارتنوئید توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۵۳، ۶۶۶ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل (a+b) و میزان کارتنوئیدها از طریق معادله‌های زیر محاسبه گردید:

$$\text{Chl a} = 15.65 A_{666} - 7.340 A_{653} \quad (۱) \text{ معادله}$$

$$\text{Chl b} = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666} \quad (۲) \text{ معادله}$$

$$\text{Chl T} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (۳) \text{ معادله}$$

$$\text{Carotenoid} = \frac{[(1000 * A_{470}) - (3.27 * \text{mg chl. a}) - (104 * \text{mg chl. B})]}{227} \quad (۴) \text{ معادله}$$

آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA): یک ماه بعد از اعمال تیمار ویروس، نمونه برداری از برگ هر تیمار جهت بررسی وجود آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌ها، با استفاده از آزمون الایزا و بر اساس روش توصیفی کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977) انجام شد. IgG- conjugate و IgG به کار رفته جهت شناسایی PVY تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان تهیه شده بود.

ارزیابی نتایج آزمون الایزا: به منظور ارزیابی نتایج آزمون الایزا از دستگاه الایزا-خوان مدل ELx800 و از طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده گردید. ملاک ارزیابی برای تعیین آلودگی، میزان جذب نور یک ساعت بعد از ریختن سوبسترا و ملاک ارزیابی برای تعیین غلظت ویروس در نمونه‌ها مقدار جذب نور چاهک‌ها بعد از یک ساعت در نظر گرفته شد. برای محاسبه حد آلودگی از فرمول زیر استفاده شد (Clark and Adams, 1977):

$$R = \bar{x} + 3SD$$

R حد آلودگی، \bar{x} میانگین جذب نور مربوط به چاهک‌های شاهد منفی و SD انحراف معیار اعداد مربوط به میزان جذب نور در چاهک‌های شاهد منفی است.

آزمون RT-PCR: ابتدا RNA کل استخراج شد (Mishra *et al.*, 2020) و سپس به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. به منظور تهیه cDNA ابتدا ۰/۵ گرم بافت آلوده برگ در سه برابر حجم بافر (استخراج) سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار با $\text{PH} = ۶/۸$ در هاون

دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. در ادامه برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و اندام هوایی، نمونه‌ها به انکوباتور با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند و پس از آن وزن نمونه‌ها بر حسب گرم و با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری گردید (Fahmideh *et al.*, 2022).

تهیه عصاره جهت اندازه‌گیری محتوی فنول و

فلاونوئید کل: به یک گرم از بافت برگ ۴/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و سپس در داخل هاون چینی خرد شد تا به صورت کاملاً هموزن و یکنواخت درآید. سپس، عصاره فوق به لوله‌های پلی‌اتیلنی منتقل گردید و به مدت ۸ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. پس از این مدت، همگن حاصله در مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی (روشناور) برداشته و برای اندازه‌گیری محتوی فنول و فلاونوئید کل استفاده شد (Abdullahi *et al.*, 2014).

اندازه‌گیری فنول کل: مقادیر فنول تام با روش فولین

سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (Ordone, *et al.*, 2008). بدین ترتیب ابتدا به ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره ۲۵ میلی لیتر واکنش گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو اضافه و مخلوط حاصله به مدت ۵ دقیقه بهم زده می‌شود و در مرحله بعد به مخلوط حاصله ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد و در نهایت جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت قراردادن نمونه‌ها در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت و سپس با استفاده از منحنی استاندارد (بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره) مقادیر فنول تام عصاره اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: میزان محتوای فلاونوئید عصاره

با روش رنگ سنجی ارزیابی شد (Chang *et al.*, 2002): بدین صورت ابتدا به هر ۰/۵ میلی لیتر از عصاره ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه گردید. در مرحله بعد به مخلوط حاصل، ۰/۱ میلی لیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه و بعد از سپری شدن ۳۰ دقیقه جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد (بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره) میزان فلاونوئید اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری شدت آلودگی: یک ماه بعد از مایه‌زنی آماربرداری به روش وریبر (Verrier *et al.*, 2001) از تیمارها با نمره دهی صفر (بدون علائم) تا نه (دارای علائم شدید) انجام شد.

COMMENTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CALL												
CalcOD	0.068	0.073	0.070	0.086	0.081	0.077	0.079	0.083	0.075	0.070	0.069	0.069
Well	SMP1	SMP9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.072	0.197	0.197	0.196	0.190	0.174	0.182	0.176	0.178	0.220	0.207	0.071
Well	SMP2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.076	0.150	0.178	0.213	0.203	0.244	0.218	0.218	0.200	0.186	0.218	0.075
Well	SMP3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.069	0.189	0.282	0.193	0.175	0.187	0.226	0.168	0.221	0.178	0.186	0.069
Well	SMP4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.073	0.179	0.177	0.183	0.186	0.187	0.188	0.180	0.188	0.188	0.177	0.077
Well	SMP5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85	SMP93
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.066	0.188	0.169	0.188	0.170	0.184	0.177	0.182	0.180	0.203	0.176	0.070
Well	SMP6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86	SMP94
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.072	0.171	0.172	0.182	0.174	0.165	0.173	0.165	0.194	0.187	0.185	0.072
Well	SMP7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87	SMP95
RSLT												
CALL												
CalcOD	0.075	0.066	0.086	0.080	0.068	0.073	0.074	0.071	0.069	0.063	0.069	0.067
Well	SMP8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88	SMP96
RSLT												

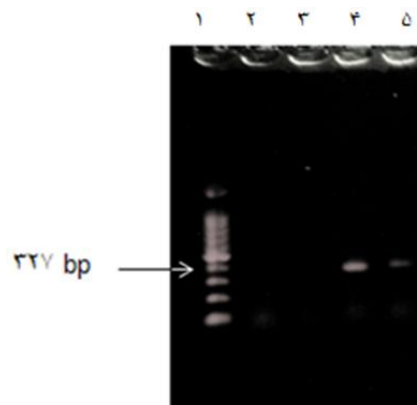
شکل ۲. در پلیت الایزا (نمونه OD)

ارتفاع بوته

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های جدول ۱ نشان داد که ارتفاع بوته‌ها تحت تأثیر سطوح تیمار رقم و مایه‌زنی ویروس قرار گرفت و اختلاف از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود اما سطوح متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود. نتایج مقایسه میانگین سطوح جدول ۲ نشان داد از نظر ارتفاع بوته بین ارقام فلفل اختلاف معنی‌دار وجود دارد به طوری که بیشترین و کمترین ارتفاع بوته به ترتیب با میانگین‌های ۱۵۰/۸۸ و ۹۶ سانتی‌متر مربوط به ارقام کائوبا و آوانته بود، از طرفی بین سطوح تیماری مایه‌زنی با ویروس و سطح شاهد اختلاف معنی‌دار برای صفت ارتفاع بوته مشاهده شد. به طوری که طی آلودگی ویروسی میزان ارتفاع بوته نسبت به سطح شاهد کاهش ۳۱/۸۴ درصدی نشان داد (جدول ۳). در راستای تایید نتایج این تحقیق مبنی بر کاهش ارتفاع ارقام فلفل طی تیمار آلودگی با ویروس PVY، در تحقیقی Sofy *et al.* (2021) اثر ویروس AMV^۱ را بر روی گیاه بادمجان بررسی و یافته‌ها نشان داد که طی تیمار آلودگی با ویروس مقدار شاخص‌های رشدی از قبیل بیوماس کل، سطح

نتایج آزمون RT-PCR

نتایج نشان داد آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای PVY قادر به شناسایی این ویروس در عصاره گیاهان تیمار شده بود و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PVY قطعاتی با اندازه ۳۲۷ bp از ناحیه CP تکثیر شد (شکل ۳) که نتایج حاصله مطابق با اندازه مورد انتظار در تحقیق Fakhrrabad *et al.* (2012) و Boonham *et al.* (2002) بوده است.



شکل ۳. الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای اختصاصی PVY. چاهک ۱: لدر یا سایز مارکر (۱۰۰۰ bp)، چاهک‌های ۲ و ۳ نمونه‌های گیاهان مایه زنی شده با بافر (شاهد) و چاهک‌های ۴ و ۵ نمونه‌های آلوده شده با بافر حاوی عصاره گیاهان آلوده به PVY.

حاصله از جدول ۴ مشخص شد که تیمار مایه‌زنی با ویروس تأثیر چشمگیر بر میزان وزن تر و خشک اندام‌هوایی داشت، به طوری که طی آلودگی ویروسی میزان وزن تر و خشک اندام‌هوایی بوته‌ها نسبت به سطح شاهد به ترتیب کاهش ۴۶/۵۵ و ۴۶/۶۱ درصدی نشان داد.

براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۴) مشخص شد که تیمار مایه‌زنی با ویروس سبب کاهش وزن تر و خشک اندام‌هوایی ارقام فلفل مورد بررسی شد به طوری که بیشترین میزان وزن تر و خشک اندام‌هوایی طی شرایط شاهد (عدم آلودگی) مربوط به رقم بنینو با میانگین‌های ۱۷/۱۶ و ۲/۸۳ گرم بود، هرچند که بین ارقام مورد بررسی در شرایط آلودگی اختلافی از لحاظ آماری مشاهده نشد ولی با مقایسه ارقام در شرایط آلودگی مشاهده شد که بیشترین وزن تر و خشک اندام‌هوایی مربوط به رقم کائوبا به ترتیب ۸/۵۲ و ۱/۶۸ گرم بود (شکل ۴).

برگ، تعداد برگ، ارتفاع گیاه و طول ریشه نسبت به سطح شاهد کاهش داشتند.

وزن تر و خشک اندام‌هوایی، کل بوته و ریشه

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برخی شاخص‌های رشدی در این آزمایش از قبیل وزن تر و خشک اندام‌هوایی تحت تأثیر تیمارهای رقم، مایه‌زنی با ویروس و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفتند به طوری که اثر تیمارهای رقم و مایه‌زنی ویروس در سطح یک درصد و اثر متقابل رقم × مایه‌زنی در سطح پنج معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین سطوح نشان داد میزان وزن تر و خشک اندام‌هوایی بین ارقام فلفل متفاوت بود به طوری که بیشترین وزن تر و خشک اندام‌هوایی بین ارقام مختلف مربوط به رقم بنینو به ترتیب با میانگین ۱۲/۵۶۱ و ۳/۷۶ گرم بود و کمترین میزان وزن تر (۸/۹۶۶ گرم) و خشک (۲/۶۸ گرم) هم مربوط به رقم آواته بود (جدول ۳). بر اساس نتایج

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس برخی خصوصیات مورفولوژیکی ارقام فلفل تحت تیمار ویروس.

Source	df	Height	Fresh_weight_aerial parts	Dry weight aerial parts	Fresh weight of the plant	Dry weight of the plant	Root fresh weight	Root dry weight	Diseases severity
Variety	6	3853.7**	10.85**	0.72**	19.54**	1.04**	1.62 ^{ns}	0.11 ^{ns}	23.45**
Inoculation	1	32448.3**	579.09**	8.64**	1146.5**	25.24**	95.9**	4.34**	108.64**
Interaction effect of variety × inoculation	6	701.8 ^{ns}	5.73*	0.309*	10.19*	0.7*	1.2 ^{ns}	0.36**	5.31**
Error	42	865.02	52.2	0.18	3.62	0.29	1.207	0.55	0.405
(CV)	-	13	12.89	13.9	14.8	11.2	12.54	12.11	8.9

ns, *, **: no significant difference, significant difference at 5% and 1% level, respectively.

جدول ۳. نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح رقم بر صفات مورفولوژیکی ارقام فلفل.

Variety	Height (cm)	Fresh_weight_aerial parts (gr)	Dry weight aerial parts (gr)	Fresh weight of the plant (gr)	Dry weight of the plant (gr)	Diseases severity
Avante	96 c	8.966 c	2.68 c	11.506 c	3.45bc	6.75a
Gassipal	148.38 bc	10.714 bc	3.21 bc	13.475 bc	4.04 ab	6.5a
Benino	138.5 a	12.561 a	3.76 a	16.17 a	4.85 a	4b
Taranto	104.50 bc	9.871 bc	2.96 b	12.72 bc	3.81 bc	3.5b
Inspershin	115.13 bc	9.88 bc	2.964 b	12.406 c	3.72 bc	3.5b
Nirvin	138.13 ab	10.88 ab	3.26 bc	12.406 bc	3.72 c	4b
Cauba	150.88 ab	11.297 ab	3.28 bc	14.806 ab	4.44 ab	2c

Similar letters for each trait between control and treated samples indicate non-significant differences between them.

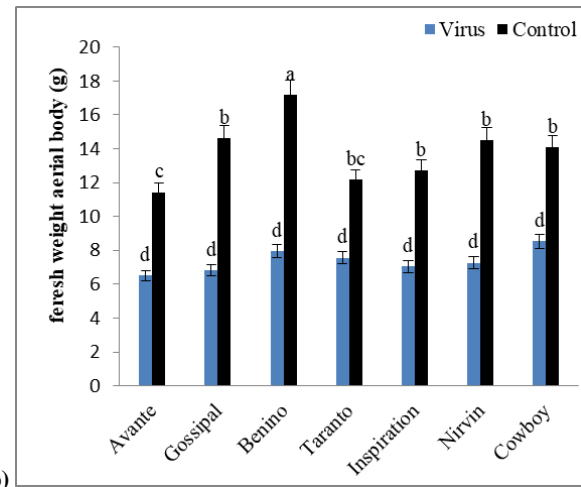
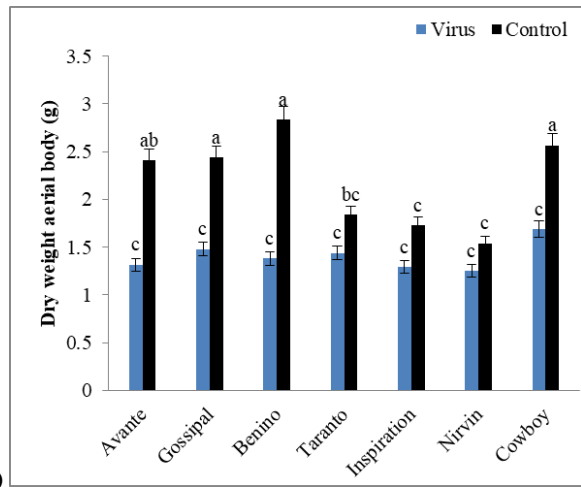
جدول ۴. نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح تیمار مایه‌زنی بر صفات مورفولوژیکی ارقام فلفل.

Inoculation treatment	Height (cm)	Fresh_weight_aerial body (gr)	Dry weight aerial body (gr)	Fresh weight of the plant (gr)	Dry weight of the plant (gr)	Root fresh weight (gr)	Root dry weight (gr)	Diseases severity
Control	151.42 a	a 13.81	a 4.14	a 18.04	a 5.41	a 4.23	a 1.7	5.71 a
Virus	103.2b	b 7.381	b 2.21	b 8.99	b 2.7	b 1.61	b 0.48	2.92 b

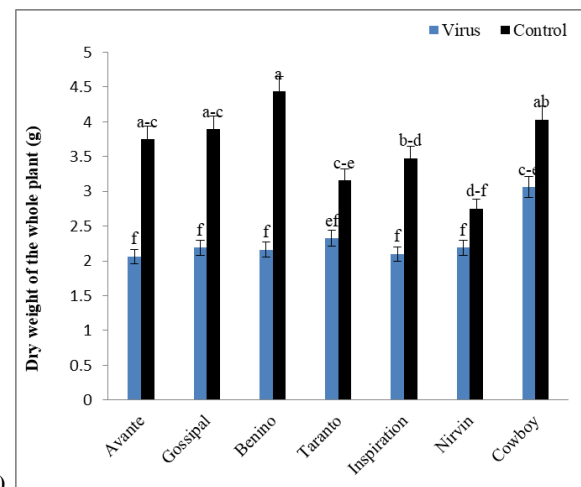
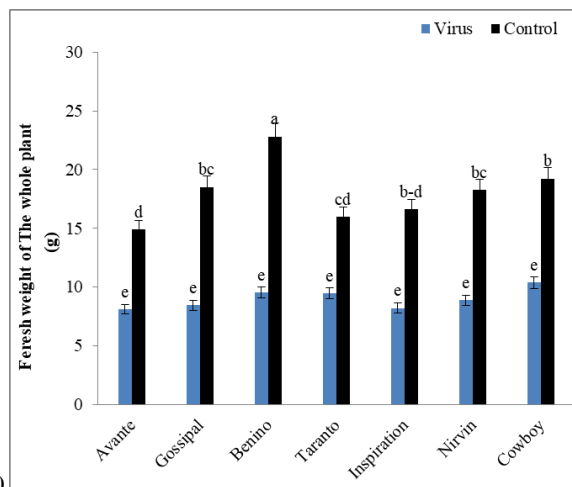
Similar letters for each trait between control and treated samples indicate non-significant differences between them.

براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم و مایه زنی ویروس مشخص شد که طی آلوده‌سازی ارقام فلفل به ویروس PVY وزن تر و خشک کل بوته‌ها نسبت به سطح شاهد (عدم آلودگی) روندی کاهشی داشتند به طوری که بیشترین وزن تر و خشک بوته‌ها طی شرایط شاهد (عدم آلودگی) مربوط به رقم بنینو با میانگین‌های ۲۲/۰۸ و ۴/۴۳ گرم بود، هرچند که بین ارقام مورد بررسی در شرایط آلودگی اختلافی از لحاظ آماری مشاهده نشد ولی با مقایسه ارقام در شرایط آلودگی مشاهده شد که بیشترین وزن تر و خشک کل بوته به ترتیب میانگین ۱۰/۷۳ و ۳/۰۶ گرم به رقم کائوبا بود و همچنین کمترین مقدار وزن تر و خشک کل نیز در شرایط آلودگی مربوط به رقم آوانته بود (شکل ۵).

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های جدول ۲ نشان داد که وزن تر و خشک کل بوته تحت تأثیر تیمار رقم، مایه‌زنی ویروس و متقابل آن‌ها قرار گرفت و اختلاف از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین سطوح جدول ۳ نشان داد از نظر وزن تر و خشک کل بوته بین ارقام فلفل اختلافاتی وجود دارد به طوری که بیشترین وزن تر و خشک کل بوته مربوط به رقم بنینو با میانگین‌های ۱۶/۱۷ و ۴/۸۵ گرم می‌باشد، از طرفی بین تیمار مایه‌زنی ویروس با سطح شاهد تفاوت‌هایی از لحاظ وزن تر و خشک کل بوته مشاهده شد، به طوری که طی آلودگی ویروسی میزان وزن تر و خشک کل بوته نسبت به سطح شاهد به ترتیب ۵۰/۱۶ و ۵۰/۰۹ درصد کاهش نشان داد (جدول ۴).



شکل ۴. (a) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر وزن تر اندام هوایی ارقام فلفل؛ (b) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر وزن خشک اندام هوایی ارقام فلفل.

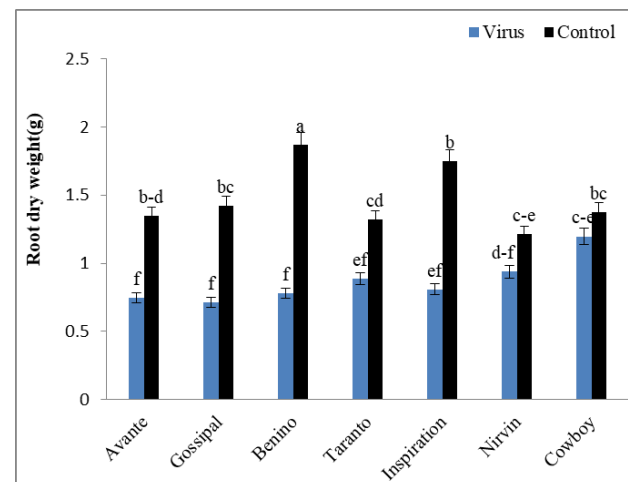


شکل ۵. (A) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر وزن تر بوته ارقام فلفل؛ (b) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر وزن خشک بوته ارقام فلفل.

بررسی طی شرایط شاهد و مایه‌زنی ویروس از لحاظ شاخص‌های رشدی تفاوت‌هایی وجود دارد که این اختلافات بین ارقام می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه در راستای سازش یا تحمل گیاهان به آلودگی ویروسی باشد (Parker and Gilbert, 2004). از طرفی با توجه به نتایج مشاهده شد که مایه‌زنی ویروس سبب کاهش ارتفاع بوته (۳۱/۸۴ درصد)، وزن تر و خشک اندام هوایی (۴۶/۵۵ و ۴۶/۶۱ درصد)، وزن تر و خشک کل بوته (۵۰/۱۶ و ۵۰/۰۹ درصد)، وزن تر و خشک ریشه (۵۱/۹۳ و ۵۴/۷۶ درصد) ارقام فلفل مورد بررسی نسبت به سطح شاهد شد. این کاهش در میزان شاخص‌های رشدی مورد بررسی در ارقام مورد بررسی فلفل طی تیمار مایه‌زنی ویروس با یافته‌های مطالعه (Jafari et al., 2015) که اثر ویروس^۱ TuMV را در لاین‌ها و ارقام تجاری کلزا، (Shamali et al., 2017) که تأثیر ویروس^۲ TSV را بر ارقام مختلف سویا، (Pazarlar et al., 2013) که اثر ویروس TMV را بر برخی واریته‌های گیاه فلفل ارزیابی نمودند، هم‌خوانی دارد.

در پژوهشی اثر تیمار مایه‌زنی ویروس ToMV بر روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه فرنگی بررسی و نتایج نشان داد که بیشترین مقدار شاخص‌های رشدی طی تیمار شاهد مشاهده شد و تیمار مایه‌زنی سبب کاهش ۲۰/۵۲ درصدی طول ساقه، ۱۸/۵۱ درصدی طول ریشه، ۲۰/۳۲ درصدی وزن خشک اندام هوایی و ۲۵/۹۲ درصدی وزن خشک ریشه نسبت به سطح شاهد شد (Aseel et al., 2019). در راستای تأیید نتایج این تحقیق مبنی بر کاهش شاخص‌های رشدی ارقام فلفل طی تیمار آلودگی با ویروس PVY، در تحقیقی (Sofy et al., 2021) اثر ویروس AMV^۳ را بر روی گیاه بادمجان بررسی و یافته‌ها نشان داد که طی تیمار آلودگی با ویروس مقدار شاخص‌های رشدی از قبیل بیوماس کل، سطح برگ، تعداد برگ، طول ساقه و ریشه نسبت به سطح شاهد کاهش یافتند. در گزارشی دیگر اثر ویروس BYMV^۴ بر گیاه *Vicia faba* cv. Giza 461 بررسی و نتایج نشان داد که طی آلودگی با ویروس میزان شاخص‌های رشدی از قبیل طول ساقه، تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی نسبت به سطح شاهد به ترتیب کاهشی ۳۵/۸۵ درصد،

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های جدول ۲ نشان داد که تیمار مایه‌زنی ویروس بر وزن تر ریشه در سطح یک درصد معنی دار بود اما تیمار رقم و اثر متقابل رقم-مایه‌زنی تأثیر معنی‌داری بر مقدار صفت فوق نداشت. نتایج مقایسه میانگین سطوح مایه‌زنی نشان داد که طی تیمار مایه‌زنی با ویروس، وزن تر ریشه نسبت به سطح شاهد کاهشی ۶۱/۹۳ درصدی نشان داد (جدول ۴). همچنین براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده شد که وزن خشک ریشه تحت تأثیر تیمار مایه‌زنی و اثر متقابل رقم-مایه‌زنی قرار گرفت و اختلاف از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شد اما اثر رقم معنی دار نبود (جدول ۲). براساس نتایج مقایسه میانگین اثر تیمار مایه‌زنی مشخص شد که در تیمار فوق وزن خشک ریشه ۷۱/۷۶ درصد نسبت به سطح شاهد کاهش داشت (جدول ۳). همچنین براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۶) مشاهده شد که در تیمار مایه‌زنی با ویروس وزن خشک ریشه ارقام فلفل مورد بررسی نسبت به سطح شاهد روند کاهشی داشت به طوری که بیشترین مقدار وزن خشک ریشه در شرایط شاهد مربوط به رقم بنینو (۱/۸۷ گرم) و کمترین مقدار آن در شرایط آلودگی مربوط به رقم گاسپیل با میانگین ۰/۷۱ گرم بود هرچند که بین این رقم با ارقام آوانته و بنینو در شرایط آلودگی اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر وزن خشک ریشه ارقام فلفل.

1 Turnip mosaic viros
 2 Tobacco streak virus
 3 Tomato Mosaic Virus
 4 Alfalfa mosaic virus
 5 Beta yellow mosaic viros

بر اساس نتایج حاصل از وزن تر و خشک اندام هوایی، کل بوته و ریشه در این تحقیق مشخص شد که بین ارقام فلفل مورد

صفات فیزیولوژیک

رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئید

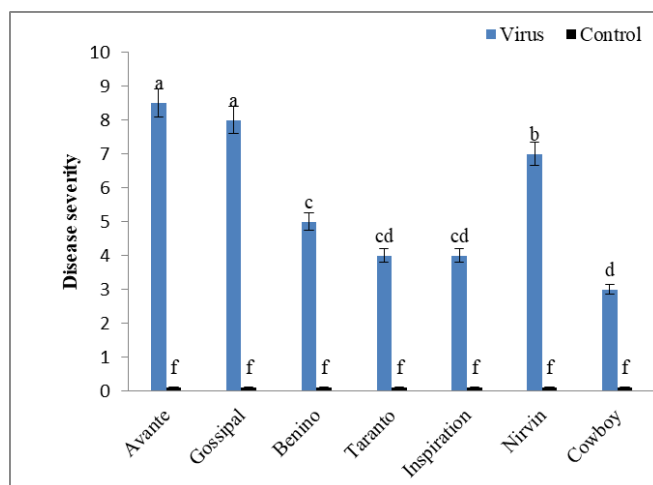
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های جدول ۵ نشان داد که اثر تیمارهای مایه‌زنی و اثر متقابل رقم مایه‌زنی بر میزان کلروفیل a در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد در حالیکه اثر رقم تأثیر معنی‌داری بر میزان صفت فوق نداشت؛ همچنین بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده شد که اثر تیمارهای رقم، مایه‌زنی و اثر متقابل رقم-مایه‌زنی بر میزان کلروفیل b و کل در سطح پنج درصد معنی‌داری بود. نتایج مقایسه میانگین سطوح جدول ۶ نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب مربوط به ارقام نیروین (۱/۵۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و اینسپرشین (۲/۹۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود در حالی که رقم گاسپیل هم دارای کمترین میزان کلروفیل b (۱/۱۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و هم کلروفیل کل (۲/۳۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. از طرفی با توجه نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح مایه‌زنی مشخص شد که طی اعمال تیمار مایه‌زنی ویروس PVY، میزان رنگیزه‌های ارقام فلفل روندی افزایشی نشان دادند به طوری که بیشترین میزان صفات فوق طی شرایط تیمار مایه‌زنی ویروس مشاهده شد (جدول ۷). براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شکل ۴ و ۵ مشخص شد که تیمار مایه‌زنی با ویروس سبب افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی ارقام فلفل مورد بررسی شد به طوری که بیشترین میزان کلروفیل a و کلروفیل کل مربوط به رقم نیروین با میانگین‌های ۲/۰۵ و ۳/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و بیشترین میزان کلروفیل b هم با میانگین ۱/۶۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مربوط به رقم آوانته بود که طی شرایط مایه‌زنی با ویروس حاصل شد هرچند که بین ارقام مورد بررسی طی شرایط آلودگی ویروسی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و کمترین میزان کلروفیل a (۰/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به رقم آوانته و کمترین میزان کلروفیل b (۰/۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) هم مربوط به رقم گاسپیل بود که طی شرایط شاهد حاصل شد (شکل ۷ و ۸).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای رقم و مایه‌زنی بر میزان کاروتنوئید در سطح پنج درصد معنی‌دار بود اما اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری بر میزان صفت فوق نداشت (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین سطوح جدول ۶ نشان داد که ارقام بنینو و آوانته به ترتیب با میانگین‌های ۱/۷۳ و

۴۰/۱۶ درصد، ۴۷/۰۷ درصد، ۴۶/۴ درصد، ۳۱/۲۶ درصد و ۴۸/۷۸ درصد داشتند (Sofy *et al.*, 2020) که با یافته‌های این مطالعه هم‌خوانی دارد. شاخص‌های رشدی از جمله مؤلفه‌های اصلی در گیاهان است و کاهش آن‌ها توسط عوامل بیماری‌زایی همچون ویروس‌ها ممکن است به دلیل تأثیر عوامل بیماری‌زا بر سیتولوژی گیاه باشد که در نتیجه آن شاخص‌های رشدی کاهش می‌یابد (Azizi & Shamsbakhsh, 2014; Vinodkumar *et al.*, 2017).

شدت آلودگی

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های جدول ۲ نشان داد که شدت آلودگی تحت تأثیر سطوح رقم، مایه‌زنی ویروس و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت و اختلاف از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین سطوح رقم (جدول ۳)، بین ارقام فلفل مورد بررسی از نظر این صفت اختلاف معنی‌دار وجود داشت به طوری که بیشترین و کمترین شدت آلودگی به ترتیب در ارقام آوانته و کائوبا مشاهده شد، همچنین بین سطوح تیمار مایه‌زنی با ویروس و سطح شاهد نیز اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۴). براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۷) مشاهده شد که پس از تیمار مایه‌زنی با ویروس در ارقام فلفل مورد بررسی، علائم شدت آلودگی بیشتر شد به طوری که بالاترین شدت آلودگی مربوط به رقم آوانته و گاسپیل و کمترین شدت آلودگی نیز مربوط به رقم کائوبا بود. لذا با توجه به نتایج حاصله رقم کائوبا در بین ارقام مورد بررسی کمتر تحت تأثیر آلودگی با این ویروس قرار گرفت و عکس‌العمل بهتری نسبت به سایر ارقام نشان داد.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر شدت آلودگی ارقام فلفل.

که اعمال تیمار مایه زنی ویروس PVY سبب افزایش میزان کاروتنوئید ارقام مورد بررسی شد.

۱/۱۱ میلی گرم بر گرم وزن تر دارای بیشترین و کمترین میزان کاروتنوئید بودند. همچنین بر اساس نتایج جدول ۷ مشخص شد

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس برخی خصوصیات فیزیولوژیک ارقام فلفل تحت تیمار ویروس.

Source	df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll Total	Carotenoid	Phenol	Flavonoid
Variety	6	0.006 ^{ns}	0.011 [*]	0.306 [*]	0.4 [*]	0.179 ^{ns}	0.484 ^{**}
Inoculation	1	1.82 ^{**}	0.27 [*]	0.19 [*]	15.83 [*]	0.209 ^{**}	12.42 ^{**}
Interaction effect of variety × inoculation	6	0.024 ^{**}	0.03 [*]	0.05 [*]	0.044 ^{ns}	0.205 [*]	0.29 [*]
Error	42	0.011	0.011	0.049	0.259	0.078	0.11
CV	--	12.43	14.63	15.91	18.52	10.65	14.42

ns, *, **: no significant difference, significant difference at 5% and 1% level, respectively.

جدول ۶. نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح رقم بر صفات فیزیولوژیک ارقام فلفل.

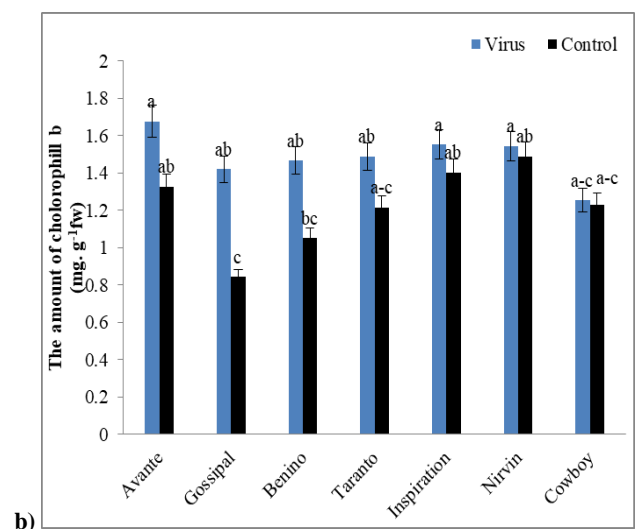
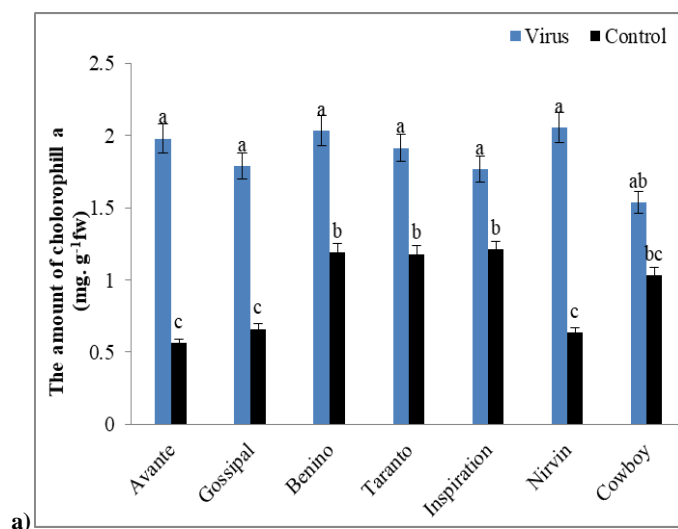
Variety	Chlorophyll b (mg.g ⁻¹ fw)	Chlorophyll Total (mg.g ⁻¹ fw)	Carotenoid (mg.g ⁻¹ fw)	Flavonoid (mg.g ⁻¹ fw)
Avante	1.502 a	1.773 ab	1.11 c	0.898 ab
Gossipel	1.131 b	2.355 b	1.417 b	0.946 a
Benino	1.25 ab	2.87ab	1.737 a	0.71 c
Taranto	1.352 ab	2.89 ab	1.449 b	0.915 ab
Inspershin	1.472 a	2.987 a	1.356 b	0.919 a
Nirvin	1.516 a	2.862 ab	1.492 b	0.894 ab
Cauba	1.24 ab	2.552 ab	1.262 bc	0.797 cb

Similar letters for each trait between control and treated samples indicate non-significant differences between them.

جدول ۷. نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح مایه زنی بر صفات فیزیولوژیک ارقام فلفل.

Inoculation Treatment	Chlorophyll a (mg.g ⁻¹ fw)	Chlorophyll b (mg.g ⁻¹ fw)	Chlorophyll Total (mg.g ⁻¹ fw)	Carotenoid (mg.g ⁻¹ fw)	Phenol (mg.g ⁻¹ fw)	Flavonoid (mg.g ⁻¹ fw)
Control	0.92 b	1.293 a	2.218 b	1.346 b	0.181 b	0.688 b
Virus	1.867 a	1.415 a	3.282 a	1.460 a	0.319 a	1.049 a

Similar letters for each trait between control and treated samples indicate non-significant differences between them.



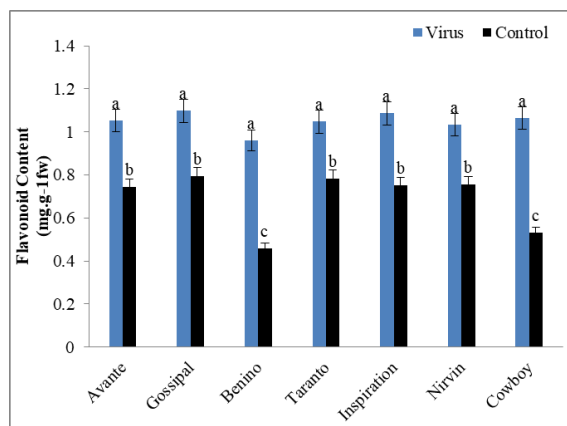
شکل ۷. (A) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه زنی ویروس بر میزان کلروفیل a ارقام فلفل؛ (b) مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه زنی ویروس بر میزان کلروفیل b ارقام فلفل.

نشان داد که طی اعمال تیمار ویروس ADV میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی از قبیل کلروفیل‌های a و b نسبت به سطح شاهد افزایش یافتند. بالا بودن میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی در این تحقیق طی تیمار ویروس PVY ممکن است به دلیل واکنش گیاه به القا مقاومت در برابر تنش ویروسی بوده باشد زیرا گیاهان برای مقابله با هر نوع تنش زیستی یا غیرزیستی تغییرات سازگاری را در خود ایجاد می‌کنند (Atkinson & Urwin, 2012).

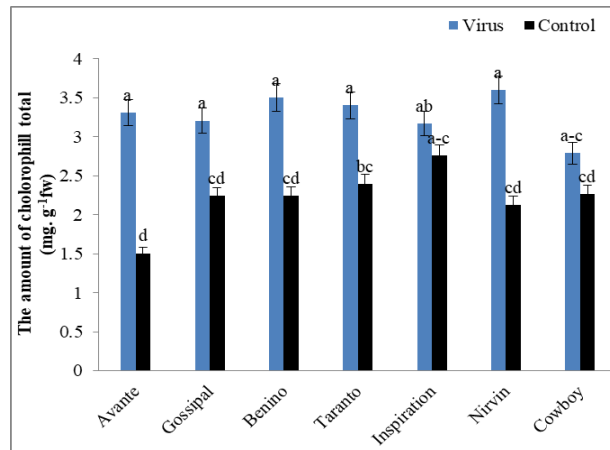
ترکیبات فیتوشیمایی

فلاونوئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد میزان فلاونوئید تحت تأثیر تیمارهای رقم، مایه‌زنی و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت به طوری که اثر تیمارهای رقم و مایه‌زنی در سطح یک درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۵). بر اساس نتایج مقایسه میانگین جدول ۶ مشخص شد که میزان تغییرات فلاونوئید بین ارقام مورد بررسی فلفل متفاوت بود به طوری کمترین و بیشترین میزان صفت فوق به ترتیب با میانگین‌های ۰/۷۱ و ۰/۹۴۶ مربوط به ارقام بنینو و گاسپیل بود، از طرفی بر اساس نتایج اثر متقابل مشاهده شد که تیمار مایه‌زنی با ویروس سبب افزایش میزان فلاونوئید در تمامی ارقام فلفل مورد بررسی شد به طوری که بین ارقام مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و بیشترین میزان مربوط به رقم گاسپیل (۱/۰۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به همراه سایر ارقام مورد بررسی بود. کمترین میزان صفت فوق هم مربوط به رقم بنینو (۰/۴۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) می‌باشد که طی شرایط شاهد (عدم تیمار مایه‌زنی) به دست آمد (شکل ۹).



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر میزان فلاونوئید ارقام فلفل.



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر میزان کلروفیل کل ارقام فلفل.

محتوی رنگیزه‌های فتوستنتزی در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوستنتزی (Jiang & Huang, 2001) و تعیین‌کننده سرعت فتوستنتز است (Ghosh *et al.*, 2004) و تغییرات در غلظت آن به عنوان یک واکنش کوتاه مدت در شرایط نامساعد رشدی در نظر گرفته می‌شود (Jiang & Huang, 2002). به طور کلی در محث افزایش یا کاهش محتوی کلروفیل‌ها تحت شرایط تنش ویروس نتایج متناقضی بر حسب گونه‌های گیاهی وجود دارد به طوری که در برخی گزارش‌ها افزایشی (Liu *et al.*, 2016; Jaime *et al.*, 2019) و در برخی دیگر کاهش (Choudhury *et al.*, 2019; Sofy *et al.*, 2020) می‌باشد و براساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد که تیمار مایه‌زنی ویروس PVY سبب افزایش محتوی رنگیزه‌های فتوستنتزی ارقام فلفل مورد بررسی شد به طوری که طی تنش ویروس میزان کلروفیل‌های a, b, کل و کاروتنوئید نسبت به سطح شاهد به ترتیب افزایشی ۵۰/۷۲، ۸/۶۲، ۳۳/۰۶ و ۸/۶۴ درصدی نشان دادند. این افزایش در میزان رنگیزه‌های فوق با یافته‌های مطالعه Harethabadi *et al.* (2023) در گوجه فرنگی و Hadi *et al.* (2015) در گیاه سیب‌زمینی هم‌خوانی دارد. این محققین در آزمایشات خود بیان کردند که در گیاهان گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی آلوده به ویروس‌های TSWV و PVY میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی نسبت به گیاهان سالم به طور معنی‌داری بیشتر بود. در تحقیق دیگری Jaime *et al.* (2019) اثر ویروس^۲ ADV را بر گیاه یونجه بررسی و نتایج

¹ Tomato spotted wilt virus

² Alfalfa dwarf virus

فلفل مورد بررسي شد به طوري كه بيشترين ميزان مربوط به رقم گاسپيل (۰/۳۹۹ ميلي گرم بر گرم وزن تر) به همراه رقم كائوبا بود كه طی اعمال تیمار مایه زنی حاصل شد و كمترین میزان صفت فوق هم مربوط به رقم كائوبا (۰/۱۱ ميلي گرم بر گرم وزن تر) می باشد كه طی شرایط شاهد (عدم تیمار مایه زنی) به دست آمد.

تركيبهای فنلی شامل گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند كه بسیاری از تركيبهای حلقوی مثل تركيبهای فنل، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنین‌ها و حتی اسیدهای آمینه حلقوی مثل تريپتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. این تركيبها دارای نقش‌های متعدد اکولوژيکی و فیزیولوژيکی نظیر نقش‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و تركيبات فنولی با مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واكنش‌های زنجیره‌وار اكسیداسیون، اهدای هیدروژن، حذف اكسیژن یكتایی، كلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراكسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این تركيبات همچنین با اهدای سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراكسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اكسیدكنندگی کمتر از تركيب‌های اولیه به وجود آورند (Tamadon & Dashat, 2021; Chu *et al.*, 2000).

این تركيبات در اثر محرك‌های متعدد محیطی نظیر حملات میکروبی، پرتوهای فرابنفش و تنش‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی گزارش شده است (Ghorbani *et al.*, 2016; André *et al.*, 2009). بر اساس نتایج این مطالعه میزان تركيبات فنولی در ارقام فلفل مورد بررسي از قبیل آوانته، گاسپیل، بنینو، تاراتو، اینسپرشین، نیروین و كائوبا طی تیمار ويروس نسبت به سطح شاهد خودشان به ترتیب افزایشی ۴۰/۶۳، ۳۵/۶۶، ۴۰/۱۲، ۴۱/۳۴، ۱۱/۳۴، ۶۴/۳۳، ۳۲/۶۶ و ۷۰/۱۸ درصدی نشان دادند و این افزایش در میزان تركيب فوق با یافته‌های مطالعه محققان در گوجه‌فرنگی آلوده به ويروس PVX^۱ (Teraoka & Balogun, 2004)، توتون آلوده به ويروس PVY (Abdolahi *et al.*, 2014)، چغندر آلوده به ويروس BNYVV (Ghorbani *et al.*, 2016) و ريحان آلوده به ويروس CMV^۲ (Saadati *et al.*, 2021) هم‌راستا است. این محققين در نتایج خود بیان کرده‌اند كه طی تیمار ويروس میزان فنول كل در گیاهان مورد بررسي نسبت به

فلاونوئیدها گروه پیچیده‌ای از تركيب‌های فنولی هستند كه به طور مستقیم باعث مهار مولكول‌های فعال سوپر اكسید، پر اكسید هیدروژن، و رادیکال‌های هیدروكسیل می‌گردد و مانند اسیدهای فنلی، استیلن، تانن‌ها، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها معمولاً در برگ‌ها و بخش‌های چوبی مانند ساقه و شاخه وجود دارند كه در مواجهه با عوامل بیماریزا و شرایط نامساعد رشدی در بافت‌های مختلف گیاهان تولید و به عنوان پیام‌رسان در گیاهان عمل و منجر به سازگاری گیاه به شرایط تنش می‌شوند (Cook & Samman, 1996; Jaakola *et al.*, 2002).

بر اساس نتایج این مطالعه میزان تركيبات فلاونوئیدی در ارقام فلفل مورد بررسي از قبیل آوانته، گاسپیل، بنینو، تاراتو، اینسپرشین، نیروین و كائوبا طی تیمار ويروس نسبت به سطح شاهد خودشان به ترتیب افزایشی ۲۹/۴۳، ۲۶/۷۶، ۵۲/۲۳، ۲۵/۲۵، ۳۰/۷۷، ۲۶/۷۶ و ۵۰/۲۳ درصدی نشان دادند و این افزایش در میزان تركيب فوق با یافته‌های Aseel *et al.* (2019) كه اثر ويروس ToMV را بر گیاه گوجه‌فرنگی مطالعه کردند، هم‌خوانی دارد. این محققين در نتایج خود بیان کرده‌اند كه طی تیمار ويروس میزان فلاونوئید در گیاهان مورد بررسي نسبت به سطوح شاهد افزایش معنی‌داری دارند كه تاییدی بر نتایج مطالعه فوق می‌باشد. در تحقیقی در سال ۲۰۲۱ اثر ويروس AMV را بر گیاه بادمجان بررسي و نتایج نشان داد كه میزان فلاونوئید كل در بوته‌های آلوده به ويروس بیشتر از بوته‌های سالم بود كه با یافته‌های این مطالعه مبنی بر اینکه طی تنش یا آلودگی با ويروس میزان فلاونوئید ارقام فلفل مورد بررسي افزایش می‌یابد، هم‌راستا است (Sofy *et al.*, 2021).

فنول

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های جدول ۵ نشان داد كه اثر تیمارهای مایه‌زنی و اثر متقابل رقم-مایه‌زنی بر میزان فنول به ترتیب در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار شد در حالی اثر رقم تأثیر معنی‌داری بر میزان صفت فوق نداشت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین سطوح تیمار مایه‌زنی مشخص شد كه اعمال تیمار مایه‌زنی ويروس PVY، میزان فنول روندی افزایشی داشت به طوري بيشترين میزان صفت فوق با میانگین ۰/۳۱۹ ميلي گرم بر گرم وزن تر طی اعمال تیمار ويروس مشاهده شد (جدول ۷). بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۱۰) مشخص شد كه تیمار مایه‌زنی با ويروس سبب افزایش میزان فنول ارقام

¹Potato Virus X

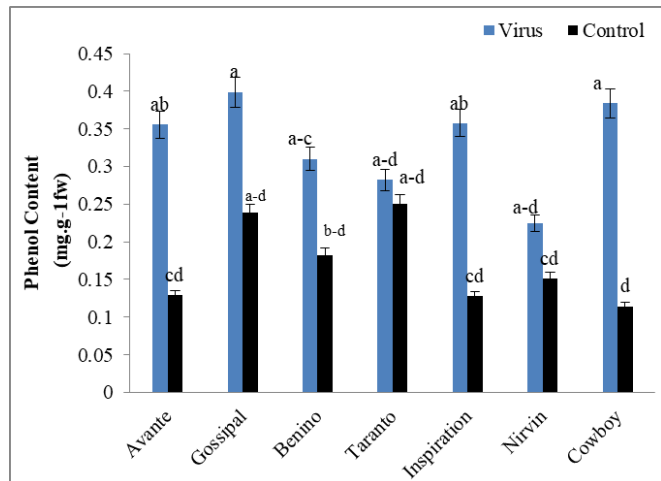
²Beet Necrotic Yellow Vein Virus

³Cucumber mosaic virus-Fny

نتیجه گیری و پیشنهادها

به طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پس اعمال آلودگی ویروسی و تأیید آلودگی در هر هفت رقم فلفل مورد بررسی، کاهش صفات مورفولوژیکی چون ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ریشه، اندام هوایی و بوته‌ها مشاهده شد و در مقابل افزایش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنول کل و فلاونوئید مشاهده گردید. به گونه‌ای که در شرایط آلودگی بیشترین وزن خشک ریشه، وزن تر و خشک بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین میزان فنول و فلاونوئید و همچنین کمترین علائم شدت آلودگی مربوط به رقم کائوبا بود، در حالی که در شرایط شاهد رقم بنینو دارای بیشترین وزن خشک ریشه، وزن تر و خشک بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین مقدار کلروفیل a بود. لذا با بررسی و مقایسه ارقام پس از اعمال آلودگی با ویروس مورد مطالعه در مرحله گیاهچه‌ای، رقم کائوبا نسبت به سایر ارقام کمتر تحت تأثیر آلودگی قرار گرفته و عکس العمل بهتری را در مواجهه با آلودگی ویروسی نشان داده است. بنابراین بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان این گونه بیان کرد که آلودگی ویروسی سبب تغییرات موفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی در گیاهان آلوده نسبت به سطح شاهد شد و افزایش یا کاهش میزان صفات مورد بررسی، وابسته به برهمکنش ویروس و ارقام بوده که به نظر می‌رسد این امر هماهنگ می‌تواند با واکنش حساسیت یا مقاومت ارقام در برابر آلودگی ویروسی مرتبط باشد. لذا با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان رقم کائوبا را در بین هفت رقم مورد بررسی فلفل جهت کشت برای مناطق آلوده به PVY و همچنین برای مطالعات آتی به‌نژادی و اصلاح ارقام فلفل پیشنهاد نمود.

سطوح شاهد افزایش معنی‌داری دارند که تأییدی بر نتایج مطالعه فوق می‌باشد. در پژوهشی Sofy *et al.* (2021) اثر ویروس *Alfalfa mosaic virus* را بر گیاه بادمجان بررسی و نتایج نشان داد که میزان فنول کل در بوته‌های آلوده به ویروس بیشتر از بوته‌های سالم بود که با یافته‌های این مطالعه همخوانی دارد. بر اساس نظر محققان افزایش ترکیبات فنولی در گیاهان آلوده به قارچ و ویروس در پاسخ به آلودگی آزاد و در محل رخ داد آلودگی به سرعت تجمع و با ترکیبات سلول‌های دیواره متصل می‌شود که در نتیجه این امر ترکیبات ساختمانی گیاه را تقویت و یا به دلیل تجمع در محل آلودگی باعث غیر فعال شدن آنزیم‌های ویروس و قارچ می‌شود (Madadkhan *et al.*, 2012; Wallace & Fry, 1994; Goodman *et al.*, 1980).



شکل ۱۰. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و مایه‌زنی ویروس بر میزان فنول ارقام فلفل.

References

- Aghmolaie, A., Nasrollanejad, S., Mostafavi Neishabouri, F. (2015). Tracking and determination of *Potato virus Y* strain by DAS-ELISA and RT-PCR from pepper fields in Golestan province. *Applied Research in Herbal Medicine* 5(1), 183-193.
- Abdolahi, A., Nasrollanejad, S., Jafari, S., Yazdaniyan, M., Taghinasab, M., (2014). Investigating changes in the amount of protein and phenolic compounds in the leaves of susceptible and resistant tobacco cultivars infected with PVY. *Plant Production Research* 22(3), 129-153 (In Persian with English abstract).
- André, C. M., Schafleitner, R., Legay, S., Lefèvre, I., Aliaga, C. A. A., Nomberto, G., ... & Evers, D. (2009). Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry*, 70(9), 1107-1116.
- Aseel, D. G., Rashad, Y. M., & Hammad, S. M. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus. *Scientific reports*, 9(1), 9692.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- Azizi, A., & Shams-Bakhsh, M. (2014). Impact of cucumber mosaic virus infection on the varietal

- traits of common bean cultivars in Iran. *Virus Disease*, 25, 447-454.
- Baebler, Š., Coll, A., & Gruden, K. (2020). Plant molecular responses to Potato Virus Y: A continuum of outcomes from sensitivity and tolerance to resistance. *Viruses*, 12(2), 217.
- Balogun, O. S., & Teraoka, T. (2004). Time-course analysis of the accumulation of phenols in tomato seedlings infected with Potato Virus X and Tobacco mosaic virus. *Biokemistri*, 16(2), 112-120.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., & Barker, I. (2002). The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVYO, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. *Journal of virological methods*, 102(1-2), 103-112.
- Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 561-566
- Clark, M. F., & Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), 475-483.
- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Dere, Ş., Güneş, T., & Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and totalcarotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish journal of Botany*, 22(1), 13-18.
- Fahmideh, L., Mazarie, A., Pahlavan, P., & Madadi, S. (2022). Effect of salinity stress on some morphophysiological and biochemical traits of two barley cultivars. *Journal of Plant Process and Function*, 11(50), 275-292.
- Fallah, T., & Nasrollanejad, S. (2009). Detection and distribution of PNRSV on stone fruits in Golestan provinces. *Journal of Plant Production*, 16, 88-98.
- Fakhrabad, F. Z., Nasrollanejad, S., Ahmadikhah, A., & Taghinasab, M. (2012). Sequencing of three isolates and prevalence of Potato virus Y in Tobacco fields of Golestan province, and phylogenetic comparison of the Iranian and world isolates of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(3).
- Fan, X., Cao, X., Zhou, H., Hao, L., Dong, W., He, C., ... & Zheng, Y. (2020). Carbon dioxide fertilization effect on plant growth under soil water stress associates with changes in stomatal traits, leaf photosynthesis, and foliar nitrogen of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104203.
- Ghorbani, A., Alamzadeh, E., Hamze, Z., Izadpanah, K. (2016). Comparison of physiological changes of resistant and sensitive sugar beet cultivars infected with *Sugar beet vein necrotic yellows virus*. *Sugar Beet* 33(2), 209-219.
- Ghosh, P. K., Ramesh, P., Bandyopadhyay, K. K., Tripathi, A. K., Hati, K. M., Misra, A. K., & Acharya, C. L. (2004). Comparative effectiveness of cattle manure, poultry manure, phosphocompost and fertilizer-NPK on three cropping systems in vertisols of semi-arid tropics. I. Crop yields and system performance. *Bioresource Technology*, 95(1), 77-83.
- Glais, L., Bellstedt, D. U., & Lacomme, C. (2017). Diversity, characterisation and classification of PVY. *Potato virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*, 43-76.
- Goodman, R. N., Király, Z., & Wood, K. R. (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease* (pp. xii+433).
- Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 7, 1-9.
- Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130(2), 729-739.
- Jafari, M., Shamsbakhsh, M., Moini, A. (2015). Reaction of commercial cultivars and rapeseed lines to *Turnip mosaic virus* isolate. *Plant Diseases* 52(2), 147-159.
- Jaime, C., Muchut, S. E., Reutemann, A. G., Gioco, J. O., & Dunger, G. (2020). Morphological changes, alteration of photosynthetic parameters and chlorophyll production induced by infection with alfalfa dwarf virus in *Medicago sativa* plants. *Plant Pathology*, 69(2), 393-402.
- Jiang, Y., & Huang, B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41(2), 436-442.
- Jafarpour, B. (1992). *Methods in Plant Virology*. Ferdosi University Press, 207p.

- Hadi, M., Balali Dehkordi, Gh., Mousavi, S.M., Hosseini, F. (2015). The effect of salicylic acid on reducing the damage caused by Y. Bazmini virus in Marfona and Agria cultivars. *Iranian Plant Biology* 6(20), 171-183.
- Haghpahanah, K., Mirfakhraee, S., Khodadadi, M., Shamsifar, S. (2020). Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars using SSR Marker and Physiological Traits Plant Pigments and Proline under Late Cold Stress. *Journal of Crop Breeding* 12 (34), 199-209.
- Harethabadi, N., Hosseini, S. A., Amini Fard M. (2023). Investigating the interaction of *Tomato spotted wilt virus* and iron on some physiological characteristics of tomato under greenhouse conditions. *Horticultural Sciences* 37(1), 205-217.
- Hu, X., Nie, X., He, C., & Xiong, X. (2011). Differential pathogenicity of two different recombinant PVY^{NTN} isolates in *Physalis floridana* is likely determined by the coat protein gene. *Virology Journal*, 8, 1-5.
- Kežar, A., Kavčič, L., Polák, M., Nováček, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Žnidarič, M. T., ... & Podobnik, M. (2019). Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein. *Science Advances*, 5(7), eaaw3808.
- Kiani, S., Babaeianjelodar, N., Bagheri, N., & Najafzarrini, H. (2018). Effect of mannitol stress on morphological, biochemical and polyphenol parameters in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. Italica). *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(2).
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Kreuze, J. F., Souza-Dias, J. A. C., Jeevalatha, A., Figueira, A. R., Valkonen, J. P. T., & Jones, R. A. C. (2020). Viral diseases in potato. *The potato crop: its agricultural, nutritional and social contribution to humankind*, 389-430.
- Liu, X., Feng, Z. M., Zhou, C. L., Ren, Y. K., Mou, C. L., Wu, T., ... & Wan, J. M. (2016). Brassinosteroid (BR) biosynthetic gene lhdd10 controls late heading and plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant cell reports*, 35, 357-368.
- Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z., & Shoorooei, M. (2012). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1. *Scientia Horticulturae*, 135, 171-176.
- Mishra, J., Srivastava, R., Trivedi, P. K., & Verma, P. C. (2020). Effect of virus infection on the secondary metabolite production and phytohormone biosynthesis in plants. *3 Biotech*, 10(12), 547.
- Mofunanya, A. A. J., Owolabi, A. T., & Nkang, A. (2015). Comparative study of the effect of Telfairia mosaic virus (TEMV) on the growth characteristics of two ecotypes of *Telfairia occidentalis* (hooker fil). *International Journal of Virology*, 11(2), 54-65.
- Ordóñez, A. A. L., Gomez, J. D., & Vattuone, M. A. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 452-458.
- Parker, I. M., & Gilbert, G. S. (2004). The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35(1), 675-700.
- Pazarlar, S., Gümüş, M., & Öztekin, G. B. (2013). The effects of tobacco mosaic virus infection on growth and physiological parameters in some pepper varieties (*Capsicum annum* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 427-433.
- Rodríguez-Calzada, T., Qian, M., Strid, Å., Neugart, S., Schreiner, M., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2019). Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 134, 94-102.
- Saadati, M., Ayari, M., Shams Bakhsh, M. (2021). The effect of Fny isolate of *Cucumber mosaic virus* infection on the physiological and phytochemical characteristics of three indigenous stands of green basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Diseases* 57(4), 303-319.
- Shamali, S., Rakhshande, R. F., Safarnejad, M., Ramzanpour, S. S. (2017). The effect of *Tobacco streak virus* on podding of different soybean cultivars under greenhouse conditions. *Plant Pests and Diseases*. 86(2), 133-145 .
- Sharifi-nezamabad, P., Nasrollanejad, S., Aghajani, M. A., Dizadji, A., Nadimi, A. (2019). The *Potato virus Y* main disease indicators in tobacco fields of Golestan province. *Pest and diseases Journal* 87(2), 227-240.
- Sofy, A. R., Hmed, A. A., Abd EL-Aleem, M. A., Dawoud, R. A., Elshaarawy, R. F., & Sofy, M. R. (2020). Mitigating effects of Bean yellow mosaic virus infection in faba bean using new carboxymethyl chitosan-titanium

- nanobiocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1261-1275.
- Tamadon, L., & Riasat, M. (2021). Effect of drought stress on some morphophysiological characteristics and phenolic compounds of rosemary plant (*Rosmarinus officinalis* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 14(2), 439-448.
- Umar, O. B., Ranti, L. A., Abdalbaki, A. S., Bola, A. L., Abdulhamid, A. K., Biola, M. R., & Victor, K. O. (2021). Stresses in plants: Biotic and abiotic. *Current Trends in Wheat Research*, 1-8.
- Verma, S., Nizam, S., & Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1*, 25-49.
- Verrier, J. L., Marchand, V., Cailleteau, B., & Delon, R. (2001). Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley tobacco. In *Proceedings of the Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco Meeting Agro-Phyto Groups, 2001, Cape Town, South Africa* (p. 29).
- Vinodkumar, S., Nakkeeran, S., Malathi, V. G., Karthikeyan, G., Amala Balu, P., Mohankumar, S., & Renukadevi, P. (2017). Tobacco streak virus: an emerging threat to cotton cultivation in India. *Phytoparasitica*, 45, 729-743.
- Wallace, G., & Fry, S. C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *International review of cytology*, 151, 229-267.
- Zamljen, T., Zupanc, V., & Slatnar, A. (2020). Influence of irrigation on yield and primary and secondary metabolites in two chilies species, *Capsicum annum* L. and *Capsicum chinense* Jacq. *Agricultural Water Management*, 234, 106104.
- Zhang, F. T., Cheng, L. F., Geng, C., Tian, Y. P., Yuan, X. F., Bai, Y. J., & Li, X. D. (2019). Detection and identification of a Potato virus Y (PVY) NTN-NW isolate from potato in Heilongjiang, China.

REVIEW ARTICLE

Investigating factors affecting the diversity and production of secondary metabolites from mysterious genes of rhizosphere microbes

Maryam Sajedmarani¹, Soheila Talesh Sasani², Shohrehi Ariaeenejad³, Akram Sadeghi^{4*}

¹Molecular Genetics Department, Gilan Campus Faculty, Rasht, Iran.

²Biology Department, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

³Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

⁴Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence

Akram Sadeghi

Email: aksadeghi@abrii.ac.ir

How to cite

Sajedmarani, M., Talesh Sasani, S., Ariaeenejad, Sh., & Sadeghi, A. (2024). Investigating factors affecting the diversity and production of secondary metabolites from mysterious genes of rhizosphere microbes. *Crop Biotechnology*, 13(46), 19-32.

ABSTRACT

Plants with special compounds in their root exudates can strengthen a specific microbial community in the rhizosphere and prevent harmful microbial community from forming. The rhizosphere is a dynamic region around the plant root that is governed by the interaction between the plant and microorganisms. Plant root secretions can be influenced by plant species, plant growth stages and stress conditions and can be different; therefore, each microbial strain can regulate the expression of its genes at each stage of plant growth. Microbes are an unknown and huge source of secondary metabolites that play a very important role in the field of medicine and other industries. The present review focuses on factors inducing the production of new secondary metabolites from rhizosphere microbes. Each microbial strain has the potential to produce several compounds, but considering that the production of secondary metabolites is very costly for the cell, their synthesis is highly controlled by the cell. Studies have shown that changing the growth conditions of microbes, such as: temperature, salinity, co-cultivation (bacteria-bacteria, fungi-fungi, bacteria-fungi), change in oxygen concentration, aeration speed, addition of soil elements and rare metal ions, light radiation and also genetic engineering methods such as: insertion of strong inducible promoters, ribosome engineering, chromatin rearrangement, overexpression of pathway-specific regulatory genes and small molecules and chemical stimuli can help to discover new compounds. In this study, the above cases are explained in detail.

KEYWORDS

Induction, Plant root secretions, Rhizosphere microbes, Secondary metabolite.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله مروری»

بررسی عوامل موثر بر تنوع و تولید متابولیت‌های ثانویه از ژن‌های مرموز میکروبی‌های ریزوسفری

مریم ساجدمرئی^۱، سهیلا طالش ساسانی^۲، شهره آریائی‌نژاد^۳، اکرم صادقی^{۴*}

چکیده

گیاهان با ترکیبات خاص در ترشحات ریشه خود می‌توانند جامعه میکروبی خاصی را در ریزوسفر تقویت کنند و از اجتماع جامعه میکروبی مضر برای خود جلوگیری کنند. ریزوسفر منطقه‌ای پویا اطراف ریشه گیاه است که توسط برهمکنش بین گیاه و میکروارگانیسم‌ها اداره می‌شود. ترشحات ریشه گیاه می‌تواند تحت تاثیر گونه گیاه، مراحل رشد گیاه و شرایط تنش قرار گیرد و متفاوت باشد؛ بنابراین هر سویه میکروبی می‌تواند بیان ژن‌های خود را در هر مرحله از رشد گیاه تنظیم کند. میکروبی‌ها منبع ناشناخته و عظیمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که نقش بسیار مهمی در عرصه درمانی و دیگر صنایع دارند. مطالعه مروری حاضر بر روی عوامل القا کننده تولید متابولیت‌های ثانویه جدید از میکروبی‌های ریزوسفری تمرکز دارد. هر سویه میکروبی پتانسیل تولید چندین ترکیب را دارد اما با توجه به این‌که تولید متابولیت‌های ثانویه برای سلول بسیار هزینه بر است، سنتز آن‌ها توسط سلول بسیار کنترل شده است. مطالعات نشان داده که تغییر شرایط رشد میکروبی‌ها، مانند: دما، شوری، کشت توام (باکتری-باکتری، قارچ-قارچ، باکتری-قارچ)، تغییر غلظت اکسیژن، سرعت هوادهی، افزودن عناصر خاکی و یون‌های فلزی کمیاب، تابش نور و همچنین روش‌های مهندسی ژنتیک مانند: قرار دادن پروموتورهای قوی القایی، مهندسی ریبوزوم، بازآرایی کروماتین و بیان بیش از حد ژن‌های تنظیم کننده خاص مسیر و مولکول‌های کوچک و محرک شیمیایی می‌تواند به کشف ترکیبات جدید کمک کند. در این مطالعه موارد فوق به تفصیل تشریح شده است.

واژه‌های کلیدی

القا، ترشحات ریشه گیاه، میکروبی‌های ریزوسفری، متابولیت‌های ثانویه.

^۱گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده پردیس گیلان، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
^۲گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
^۳بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
^۴بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

اکرم صادقی

رایانامه: aksadeghi@abrii.ac.ir

استناد به این مقاله:

ساجدمرئی، مریم؛ طالش ساسانی، سهیلا؛ آریائی‌نژاد، شهره و صادقی، اکرم (۱۴۰۳). بررسی عوامل موثر بر تنوع و تولید متابولیت‌های ثانویه از ژن‌های مرموز میکروبی‌های ریزوسفری. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۵)، ۱-۱۴.

مقدمه

مورد نیاز دیگر لازم هستند؛ بنابراین، سنتز متابولیت‌های ثانویه به شدت تنظیم می‌شود و اعتقاد بر این است که سنتز آن‌ها در پاسخ به شرایط محیطی خاص فعال خواهد شد (van Wezel and McDowall, 2011). یکی از راه‌های کشف متابولیت‌های ثانویه جدید، کشت باکتری‌های به اصطلاح غیر قابل کشت می‌باشد؛ اصطلاح غیرقابل کشت برای توصیف ارگانیسم‌ها، به ویژه باکتری‌هایی که در محیط‌های مصنوعی رشد نمی‌کنند، استفاده می‌شود؛ به عبارت دیگر، ما اطلاعات زیستی (بیولوژیکی) کافی برای کشت این باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی نداریم و پیشنهاد شده است که این سلول‌ها زنده نیستند و بنابراین هرگز در آزمایشگاه رشد نمی‌کنند؛ اما در واقع، نشان داده شده که بسیاری از این سلول‌ها از نظر متابولیسی فعال هستند و یک تخمین نشان می‌دهد که تعداد آنتی‌بیوتیک‌های این منابع کشت نشده دو تا سه مرتبه بیشتر از منابع کشت شده است (Nichols *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2023).

با گسترش دانش یک استراتژی برای این باکتری‌های غیر قابل کشت پیدا شده، و آن تقلید از محیط میکروارگانیسم هدف است (جایگزینی رشد *in vitro* با کشت *in vivo* در زیستگاه طبیعی)؛ به عنوان مثال کشف یک آنتی‌بیوتیک جدید با نام تیکسوباکتین (Teixobactin) از یک باکتری خاک که پیش از این کشت نشده و متعلق به β - پروتئوباکتری‌ها است، با استفاده از *isolation chip (iChip) method* انجام شده است (Nichols *et al.*, 2010, Piddock, 2015).

iChip از یک تراشه جداسازی و صدها چاهک تشکیل شده است؛ این روش توانایی بالایی برای کشت گونه‌های باکتریایی غیر قابل کشت در شرایط آزمایشگاهی را دارد؛ در این روش گونه‌های باکتری در محیط طبیعی خود رشد می‌کنند، بدین صورت که نمونه خاک در آگار مذاب و مواد مغذی رقیق می‌شود و به طوری که تنها یک سلول در هر یک از چاهک‌های iChip رشد کند، تراشه را در یک غشای پلاستیکی نیمه تراوا محصور شده قرار داده و دوباره در خاک دفن می‌کنند تا مواد مغذی را که در آزمایشگاه وجود ندارد و برای ما شناخته شده نیست جذب کرده و رشد کند (Nichols *et al.*, 2010, Dos Santos *et al.*, 2022).

ریزوسفر نقطه داغ انتقال اطلاعات

ریزوسفر (محیط اطراف ریشه گیاهان) یک منطقه پویا است که توسط ارتباطات پیچیده بین گیاهان و میکرو ارگانیسم‌هایی که در

در سال‌های اخیر محققان روی تاثیر مثبت و منفی میکروپها بر گیاهان مانند تاثیرات محرک رشدی و بیوکنترلی مطالعات گسترده‌ای داشته‌اند، این درحالیست که مطالعه روی تاثیر گیاهان بر میکروپهای ریزوسفری کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Sadeghi *et al.*, 2017; Abbasi *et al.*, 2019). ترشحات ریشه با توجه به ژنوتیپ گیاه حاوی ترکیبات متنوعی مانند قندها، پپتیدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها و اسیدهای چرب است. همچنین، گیاهان می‌توانند DNA خارج سلولی (exDNA) را از طریق سلول‌های مرزی خود آزاد کنند (Sheng *et al.*, 2023).

یکی از انواع مهم اسیدهای نوکلئیک، MiRNAها هستند که از طریق ریشه‌ها تراوش و به عنوان یک منبع زیستی، مواد مغذی و انرژی را برای رشد میکروپها فراهم کرده و همچنین یک سیگنال (پیام) برای شکل دادن به میکروبیوم ریزوسفر باشند (Sheng *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023). متابولیت‌های میکروبی، منبع عظیمی از مواد شیمیایی زیست فعال، برای کشف دارو و آنزیم‌ها هستند (Rutledge and Challis, 2015, Kouroshnia *et al.*, 2022) و گیاهان می‌توانند با ترشحات خود بر فراوانی و تنوع میکروپهای ریزوسفری تاثیر گذاشته و خوشه‌های ژنی تولید کننده این متابولیت‌های ثانویه را در میکروپها فعال کنند (Lyu and Smith, 2022). داده‌های ژنومی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک اغلب ناسازگاری بین تعداد خوشه‌های ژنی شناسایی شده به عنوان تولید کننده‌های متابولیت‌های ثانویه و تعداد متابولیت‌های ثانویه شیمیایی تولید شده توسط هر میکروارگانیسم را نشان می‌دهند (Bentley *et al.*, 2002).

بر این اساس برخی از خوشه‌های ژنی به طور کلی به عنوان (خاموش) در نظر گرفته می‌شوند، یعنی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی بیان نمی‌شوند. بیان این خوشه‌های خاموش می‌تواند امکان کشف مولکول‌های جدید را فراهم کند؛ حتی نشان داده شده است که عوامل محیطی و فراوانی پیش سازهای درون سلولی می‌تواند سبب مشتق شدن ترکیبات متعدد از یک مسیر ژنی منفرد شود (Bentley *et al.*, 2002).

تولید این متابولیت‌های ثانویه برای سلول بی هزینه نیست؛ برای تولید آنها، فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی، وجود پیش سازهای مولکولی و برای بالغ شدن و ساخت ترکیب نهایی انرژی و منابع

ثانویه در اکتینومیست‌ها با تابش نور سبز تک رنگ با شدت بالا، کشف آنتی بیوتیک‌های مرموز را که معمولاً در شرایط کشت تاریک معمولی تولید نمی‌شوند تسهیل می‌کند. با این حال، شدت و مدت تابش موثر نور سبز که برای فعال کردن مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه مورد نیاز است، ممکن است در بین اکتینومیست‌ها به طور قابل توجهی متفاوت باشد (Kanchanabanca et al., 2024).

تأثیر ترشحات ریشه بر تنوع جمعیت میکروبی‌های ریزوسفر

در گیاهان، مسیرهای متابولیک ثانویه، تنوعی از ترکیبات به نام متابولیت‌های ثانویه گیاهی (PSMs) را تولید می‌کنند؛ PSMها حاوی گروه بزرگی از ترکیبات ساختاری متنوع هستند که از متابولیت‌های اولیه یا واسطه‌های موجود در مسیرهای بیوسنتزی این متابولیت‌ها منشأ می‌گیرند؛ PSMها با توجه به مسیرهای بیوسنتزی خود، به طور کلی به چندین خانواده مولکولی بزرگ شامل فنولیک‌ها، تریپن‌ها، استروئیدها، آلکالوئیدها و فلاوانوئیدها طبقه بندی می‌شوند (Tholl et al., 2005).

ترکیب ترشحات گیاهی می‌تواند تحت تأثیر گونه گیاهی، مراحل رشد گیاه، قرار گرفتن در شرایط تنش و گاهی اوقات تنوع در گیاهان همان گونه قرار گیرد؛ به عنوان مثال، در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* (*Arabidopsis thaliana*)، بیش از ۵۰۰ ترکیب در مراحل مختلف رشد تولید می‌شود؛ در نتیجه جمعیت‌های باکتریایی می‌توانند با استفاده از ترشحات ریشه در هر مرحله گیاهی، بیان ژن‌های خود را تنظیم کنند (Zhao et al., 2021, Mönchgesang et al., 2016).

انتشار ترشحات ریشه در ریزوسفر توسط گیاهان، جامعه میکروبی متناسب با آن را حمایت می‌کند و در عین حال از تنوع و گسترش جوامع میکروبی مضر برای گیاهان جلوگیری می‌کند، که به نوبه خود به گیاهان امکان سازگاری را می‌دهد (Zhao et al., 2021). در کل، تنوع میکروبی‌ها در ریزوسفر مستقیماً به خواص خاک، نوع خاک و متابولیت‌های ترشح شده از گیاه بستگی دارد، ژنوتیپ‌های گیاهی مختلف و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، محیط خاصی را برای تشکیل یک میکروبیوم ایجاد می‌کنند (Lareen et al., 2016). عباسی و همکاران تأثیر باکتری‌های محرک رشد با قابلیت بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی را بر جمعیت باکتریایی خاک نشان دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که برخی از باکتری‌ها در تعامل با گیاه می‌توانند برخی

ارتباط نزدیک با ریشه هستند اداره می‌شود؛ ترشحات ریشه باعث ایجاد ریزوسفر غنی از مواد مغذی می‌شود که فعالیت میکروبی را تحریک می‌کند؛ همچنین ترکیب و الگوی ترشحات ریشه بر فعالیت، تعداد و تنوع جمعیت میکروبی تأثیر می‌گذارد (Buhian and Bensmihen, 2018; Lyu et al., 2020; Akbari et al., 2016).

انتقال اطلاعات در تعاملات میکروبی - گیاه، میکروبی - میکروبی و گیاه - گیاه از طریق سیگنال‌هایی از جمله هورمون‌های گیاهی و سایر متابولیت‌های ثانویه ترشح شده از ریشه اتفاق می‌افتد؛ برقراری چنین ارتباطی به سیگنال‌های ریشه و سیگنال‌های میکروبی متکی است؛ سیگنال تولید شده توسط گیاه می‌تواند سیگنالی را که توسط یک میکروبی منتشر می‌شود را القاء یا از تولید آن جلوگیری کند، به این صورت می‌تواند ماهیت مثبت و یا منفی داشته باشد (Desurmont et al., 2014).

OSMAC (one strain many compounds)

میکروبی‌ها نمی‌توانند در شرایط کشت استاندارد به طور کامل پتانسیل بیوسنتزی خود را نشان دهند (Martín- et al., 2023). هر سویه میکروبی پتانسیل تولید چندین ترکیب را دارد، اما تنها برخی از این ترکیبات را تحت شرایط رشدی خاص تولید می‌کند. بنابراین، تغییر در پارامترهای کشت مانند محتوای مواد مغذی، دما و سرعت هوادهی، شرایط نور، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن می‌تواند فیزیولوژی یک سویه میکروبی را تغییر دهد و به نوبه خود به طور قابل توجهی بر متابولیسم ثانویه آن تأثیر بگذارد و در نتیجه باعث تولید و کشف متابولیت‌های ثانویه جدید شود (Bode et al., 2002; Abdelwahab et al., 2018). در مطالعه‌ای با تغییر پارامترهای کشت، مانند دما، شوری، هوادهی و حتی شکل فلاسک‌ها نشان داده شد که قارچ *Aspergillus ochraceus*، که تصور می‌شد فقط متابولیت آسپینونن (*Aspinonene*) را تولید می‌کند، قادر به تولید ۱۵ متابولیت دیگر هم است (Hemphill et al., 2017).

نور، یک محرک خارجی ضروری برای اکثر میکروارگانیسم‌ها است و می‌تواند برای دستکاری فرآیندهای فیزیولوژیکی آنها مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه‌ای دیده شد که تابش نور سبز تک رنگ با شدت بالا منجر به تولید اکتینورودین (*Actinorhodin*) شد. تحریک با نور سبز بیان ActII-ORF4، یک تنظیم کننده مسیر خاص بیوسنتز ACT در *Streptomyces coelicolor* A3 را تسریع می‌کند. این رویکرد تحریک مسیرهای بیوسنتز متابولیت

۸۲ درصد از نیتروژن مورد نیاز خود را از جو تامین کند؛ موسیلاژ ذرت سرشار از مونوساکاریدهایی مانند آرابینوز، فوکوز، گالاکتوز، زایلوز، اسید گلوکورونیک و مانوز می‌باشد. برخلاف بسیاری از انواع ذرت اصلاح شده، یک وارینه ذرت در منطقه Sierra Mixe Oaxaca می‌تواند ریشه‌های هوایی گسترده‌ای ایجاد کند و مقادیر زیادی موسیلاژ را پس از باران ترشح کند (Van Deynze et al., 2018).

نقش گیاهان در تغییر ژنتیکی میکروب‌ها

تعامل بین گیاهان و میکروب‌های ریزوسفری می‌تواند علاوه بر پیتیدهای ترش‌حی، تحت تاثیر Mobile Genetic Element (MGEs) از جمله DNA و RNA هم قرار گیرد؛ نمونه‌هایی از MGEها شامل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و پروفازها هستند، اما انتقال کلاسیک MGE معمولاً شامل انتقال DNA می‌باشد (Frost et al., 2005).

ریزوسفر، کانون انتقال MGE است؛ علاوه بر عوامل محیطی، ترشحات ریشه نیز در تنظیم انتقال MGE بین میکروب‌ها در ریزوسفر نقش دارند؛ میکروب‌ها (باکتری‌ها، قارچ‌ها و اومیسیت‌ها) و گیاهان در کنار هم، در ریزوسفر وجود دارند، این موجودات زنده برای انطباق با حضور یکدیگر و محیطی که دائماً در حال تغییر است، ارتباطات گسترده‌ای با یکدیگر دارند (Venturi and Keel, 2016).

مطالعات نشان می‌دهد که انتقال MGEs در ریزوسفر باعث تکامل سازگاری گونه‌ها با محیط اطراف می‌شود؛ به عنوان مثال انتقال MGE بین باکتری‌ها برای تخریب مواد سمی موجود در خاک به عنوان یک استراتژی بقا برای باکتری‌ها شناخته شده است (Zeng et al., 2021).

انتقال MGE می‌تواند در یک قلمرو مشابه، مانند بین باکتری‌ها، یا بین قارچ‌ها و یا بین میکروب‌ها و گیاهان رخ دهد؛ این انتقال‌ها تحت تاثیر ترشحات ریشه و عوامل محیطی، مانند: دما، ترکیب خاک و ترشحات ریشه گیاه قرار می‌گیرد (Hashimoto et al., 2019; Banerjee et al., 2016). به عنوان مثال دما یک عامل محیطی مهم است که بر انتقال MGE تأثیر می‌گذارد و مشخص شده است که در محدوده دمایی بین ۱۰-۳۵ درجه سلسیوس، فرکانس انتقال MGE با افزایش دما، افزایش خواهد داشت (Wang et al., 2014). انتقال موفقیت‌آمیز DNA به روی غشای باکتری ممکن است به توالی

از جمعیت‌های باکتریایی مانند سیانوباکتری‌ها را تقویت کنند (Abbasi et al., 2021).

در ذرت، متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند بنزوکسازینوئیدها، باکتری کلروفلکسی (*Chloroflexi*) را جذب کرده و بر تجمع میکروبیوم‌های ذرت تأثیر می‌گذارند که متعاقباً ظرفیت این گیاه را برای سازگاری با محیط افزایش می‌دهند (Cotton et al., 2019).

ترکیبات غیرفرار مانند کومارین‌ها (Coumarin) (زیر گروهی از ترکیبات فنلی) و فلاونوئیدها توسط بسیاری از گونه‌های گیاهی تولید می‌شوند و در ریزوسفر رایج هستند؛ کومارین‌ها از طریق مسیر فیل پروپانوئید تولید می‌شوند و در پاسخ گیاهان دو لپه‌ای به کمبود آهن نقش دارند (Knudsen et al., 2006). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که کومارین‌ها، می‌توانند بر ترکیب میکروبیوم ریزوسفر تأثیر بگذارند و سمیت متفاوتی برای میکروارگانیزم‌های مفید و بیماری‌زا دارند. به عنوان مثال، یک جهش حذفی *آ. تالیانا* در ژن بتا گلوکوزیداز BGLU42، با کاهش تولید کومارین موجب افزایش فراوانی نسبی پروتوباکتری‌ها و کاهش فیرمیکوت‌ها *Firmicutes* در اطراف ریشه می‌شود. آزمایش‌های بیشتر نشان داد که یک ترکیب کومارین خاص به نام اسکوپولتین (Scopoletin) رشد پاتوژن‌های موجود در خاک را مهار می‌کند در حالی که بر سایر ریزوباکتری‌ها تأثیری ندارد (Ahn et al., 2010; Stringlis et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر از ذرت جهش یافته در ژن bx1 که موجب کاهش بنزوکسازینوئید می‌شود استفاده شد. نتایج تجمع بیشتر جوامع مختلف باکتریایی و قارچی را در ریشه در مقایسه با ذرت جهش نیافته نشان داد. چنین اثراتی را می‌توان در چندین نسل از محصول ذرت شناسایی کرد، که نشان دهنده این است که این مولکول‌ها احتمالاً عوامل کلیدی در تعاملات میکروب - گیاه - ریزوسفر هستند (Kudjardjie et al., 2019).

فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه گیاهی دیگری هستند که از ریشه آزاد می‌شوند. فلاونوئیدها به طور مستقیم بیان ژن‌های باکتری‌های موجود در نودول (گره) ریشه را تحریک کرده و سبب تولید لیپو کیتو الیگوساکارید (LCO) می‌شوند که برای تشکیل گره‌ها ضروری است (Ma et al., 2016; Mhlongo et al., 2018).

مطالعه‌ای دیگر بر روی ذرت مکزیک نشان داد که موسیلاژ مرتبط با ریشه‌های هوایی ذرت می‌تواند میکروبیوم پیچیده دیازوتروف را تغذیه کند؛ میکروبیوم دیازوتروفیک شامل میکروب‌های حاوی نیتروژناز فعال است که به جذب ازت هوا توسط گیاه کمک می‌کند. این مکانیسم به ذرت اجازه می‌دهد تا

می‌دهند؛ برای مثال، به نظر می‌رسد، miR159c بیشتر mRNA های مرتبط با سرین را هدف قرار می‌دهد، در حالی که miR158a- 3p، ژن‌های بیوسنتز ایزولوسین، لوسین و والین را هدف قرار می‌دهد؛ بر این اساس، گیاهان جهش یافته برای RNA های کوچک، جوامع میکروبی متفاوتی را در ریزوسفر خود جای می‌دهند (Middleton *et al.*, 2022).

نقش گیاهان در انتقال پلاسمید بین میکروب‌های ریزوسفر

کاشت گیاه به خودی خود فرایندی است که موجب افزایش فرکانس انتقال MGE بین باکتری‌های خاک می‌شود؛ به عنوان مثال، مشخص شده که کاشت گوجه فرنگی، ذرت و گندم باعث افزایش انتقال پلاسمید بین باکتری‌های خاک می‌شود (Wang *et al.*, 2017; Hui *et al.*, 2014). هر چند گیاهان مختلف تأثیر متفاوتی بر فرکانس انتقال پلاسمید دارند، احتمالاً محتویات ترشحات ریشه گونه‌های گیاهی دلیل این تفاوت‌ها هستند. به عنوان مثال در میان گیاهان گوجه فرنگی، ذرت و گندم، گوجه فرنگی بیشترین تأثیر را بر فرکانس انتقال پلاسمید بین باکتری‌های خاک دارد؛ طبق مطالعات انجام شده، اسیدهای آلی شناسایی شده در ترشحات ریشه گیاه گوجه فرنگی، می‌تواند تحرک و پاسخ کموتاکسی باکتری‌ها را تحریک کند؛ همچنین مشخص شده که فرکانس انتقال پلاسمید در ریزوسفر نخود بیشتر از ریزوسفر جو است (Rajkumar *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013).

در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که محدوده معینی از غلظت فنل در خاک بر انتقال پلاسمید بین باکتری‌ها تأثیر گذار است؛ زیرا، زمانی که خاک با فنل تیمار شد، کاشت ذرت باعث افزایش انتقال پلاسمید در بین باکتری‌های خاک شد؛ بر این اساس ترشحات ریشه گیاه ذرت همراه با تیمار فنل برای تسهیل انتقال MGE پیشنهاد شده است (Rajkumar *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2019).

عوامل موثر بر القاء ژن‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه در میکروب‌های ریزوسفری

پروموتورهای قوی و مصنوعی

قرار دادن پروموتورهای قوی القائی منجر به فعال شدن خوشه‌های ژنی مرموز رمز کننده آنتی بیوتیک‌ها می‌شود؛ ژن‌های بیوسنتز کننده متابولیت‌های ثانویه را که معمولاً خاموش هستند و یا

DNA بستگی داشته باشد، برخی از گونه‌های باکتریایی فقط قادر به گرفتن DNA از گونه خود یا خویشاوندان نزدیک خود (DNA همولوگ) هستند، در حالی که به نظر می‌رسد باکتری‌های دیگر بین DNA همولوگ و DNA گونه‌های دورتر (DNA هترولوگ یا واگرا) تمایز قائل نمی‌شوند؛ ادغام ژن‌ها در ژنوم باکتری‌های گیرنده به همسانی توالی بین DNA گرفته شده و DNA باکتری گیرنده وابسته است و به نظر می‌رسد که درجه هترولوژی بین این توالی‌ها، عامل اصلی تعیین کننده است؛ به عنوان مثال، در مطالعه‌ای شواهد نشان می‌دهد که باکتری خاکزی *Acinetobacter* sp. BD413 DNA ژن‌های وارد شده به گیاهان تراریخته را جذب می‌کند (Gebhard and Smalla, 1998). باکتری‌های پذیرنده از پیلی نوع IV خود برای اتصال و کشیدن DNA دو رشته‌ای خارج سلولی از طریق غشاء یا لایه پپتیدوگلیکان خود استفاده می‌کنند اما برخی باکتری‌ها ممکن است DNA خارجی را از طریق vesiduction، یعنی همجوشی غشایی با یک وزیکول حاوی DNA یا RNA جذب کنند (Middleton *et al.*, 2022).

نقش miRNA های ترشح شده از ریشه گیاه بر میکروب‌های ریزوسفر

یک کلاس مهم از اسیدهای نوکلئیک miRNAها هستند. این عوامل ژنتیکی RNA های غیر کد کننده کوچکی هستند که بیان ژن هدف را از طریق مکمل بودن توالی، کنترل می‌کنند. miRNAها، از طریق ریشه‌ها تراوش شده و به عنوان ابزاری برای مهندسی میکروبیوتای ریزوسفر عمل کنند (Mhlongo *et al.*, 2018). حضور miRNA های خاص گیاهی در ریزوسفر و همچنین وجود آن‌ها در باکتری‌های ریزوسفری و عدم وجود آن‌ها در خاک‌های کشت نشده (بایر)، نشان دهنده جذب miRNA توسط باکتری‌های ریزوسفری است (Middleton *et al.*, 2022).

بسیاری از miRNAها در نوک ریشه یا همان ناحیه مریستمی اولیه تجمع دارند؛ بنابراین نوک ریشه می‌تواند کانون باکتری‌های فعال باشد؛ جالب توجه اینکه در ریشه‌ها، miRNAها الگوهای بیانی خاصی دارند، برخی تنها توسط سلول‌های ریشه تراوش می‌شوند؛ همچنین تصور بر این است که miRNAهای گیاهی جذب شده توسط ریزوباکتری‌ها، عمدتاً ژن‌های مربوط به انتقال و متابولیسم اسیدهای آمینه، به ویژه در باکتری‌های خانواده‌های *Bacillaceae* و *Paenibacillaceae* را هدف قرار

افزایش تولید آنتی بیوتیک در باکتری‌ها، مورد هدف قرار گرفت. در این آزمایش اعمال جهش‌های ریبوزومی، برای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی، سپس، انتخاب آن‌ها روی محیط آگار حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین انجام شد. به طور مشابه، جهش‌یافته‌های RNA پلیمراز (RNAP) با رشد سلول‌ها روی محیط آگار حاوی Rifampicin که به RNAP متصل می‌شود، تا سنتز RNA را مهار کند نیز شناسایی شدند؛ این جهش‌یافته‌ها نه تنها به دلیل توانایی‌شان در تولید مقادیر زیاد آنتی بیوتیک‌ها انتخاب شدند، بلکه منجر به تولید آنتی بیوتیک‌های جدید نیز شدند (Ochi et al., 2004).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، از میان ۱۰۶۸ باکتری تولیدکننده آنتی بیوتیک جدا شده از خاک (۶ درصد اکتینومیست‌ها و ۴۳ درصد گونه‌های استرپتومایسین) تعدادی که کمتر از حد بهینه آنتی بیوتیک تولید می‌کردند و یا اصلاً تولید نداشتند، برای القاء تولید آنتی بیوتیک، انتخاب شدند. مطالعه دقیق‌تر نشان داد که افزایش تولید آنتی بیوتیک به دلیل جهش Lys-88 به Glu یا Arg در پروتئین ریبوزومی S12 ایجاد می‌شود که سنتز پروتئین را در شرایط رشد فاز ثابت افزایش می‌دهد. همچنین، یک جهش His 437 به Asp یا Leu در زیرواحد RNAP β نیز یافت شد که میل پیوند به پروموتور را در آن افزایش می‌دهد (Chai et al., 2012).

آنتی بیوتیک‌هایی مانند Erythromycin و Gentamicin که ریبوزوم را هدف قرار می‌دهند نیز سطح یکسانی از افزایش در تولید آنتی بیوتیک را ایجاد می‌کنند (Imai et al., 2012).

فعال کننده‌ها و سرکوب کننده‌های رونویسی

خوشه‌های ژنی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه حاوی یک یا چند ژن هستند که فاکتورهای رونویسی را رمزگذاری می‌کنند. مشخص شده که خانواده تنظیم کننده رونویسی LysR-Type (LTTR) که در میان اکتینوباکتری‌ها، پروتئوباکتری‌ها و فیرمیکوت‌ها فراوان هستند، معمولاً دارای دو دومین هستند. دومین N- ترمینال مرتبط با اتصال به DNA و دومین C- ترمینال مرتبط با اتصال به لیگاند است، که فعال شدن آن، سنتز آنتی بیوتیک β -لاکتام cattleya thienamycin در *Streptomyces* را آغاز می‌کند (Maddocks and Oyston, 2008). به طور مشابه، پروتئین LysR که به عنوان ORF-L16 نامگذاری شده است، بیوسنتز Spinomycin را در

حداقل بیان را دارند را می‌توان، با استفاده از پروموتورهای قوی در ناقل‌های پلاسمیدی مناسب کلون کرد (Shao et al., 2013). مسیرخاموش spectinabilin در *Streptomyces orinoci* و مسیر تارومایسین (Taromycin) در *Saccharomonospora* sp. با استفاده از این روش شناسایی شده‌اند؛ همچنین به طور مشابه، یک خوشه ژنی مرموز بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک در *Streptomyces griseus* گزارش شده که تولید سه ماکرولاکتام تترامات چند حلقه‌ای جدید را القاء می‌کند. در *Escherichia coli*، لیوپپتیدهای آلتروکرومید با منشاء *Pseudoalteromonas piscicida* به صورت هترولوگ و با استفاده از پروموتور *E. coli* T7 بومی بیان می‌شود؛ بیان یک خوشه ژن آنتی بیوتیکی خاموش در *Streptomyces* نیز با استفاده از پروموتور قوی ermE به دست آمده است (Ross et al., 2015).

بیان بیش از حد ژن‌های تنظیم کننده خاص مسیر

در طی انتقال باکتری از فاز رشد تاخیری به فاز ثابت رشد، بیان بیش از حد یک پروتئین تنظیم کننده سنتز آنتی بیوتیک در *Streptomyces* گزارش شده است که عملکرد تولید آنتی بیوتیک را افزایش می‌دهد. همچنین، بیان یک تنظیم کننده LAL (یک کلاس منحصر به فرد از ژن رمز کننده پروتئین شبیه به تنظیم کننده‌های بزرگ ATPBinding خانواده LuxR) خاص مسیر، از خوشه ژنی پلی کتید سنتاز مدولار نوع I (PKS) در *ambofaciens* *Streptomyces* منجر به تولید استامبومایسین (Stambomycin) می‌شود (Laureti et al., 2011).

به طور مشابه مشاهده شده است که بیان بیش از حد afsS (یک پروتئین ۶۳ اسید آمینه‌ای) باعث تولید آنتی بیوتیک انتخابی در *S. coelicolor* و *Streptomyces lividans* می‌شود. همچنین، بیان بیش از حد afsR می‌تواند باعث تولید آنتی بیوتیک در *S. coelicolor* و *S. peucetius* شود. بیان بیش از حد ژن‌های تنظیم کننده پروتئین تنظیم کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین (SARP) که بیان PapR2 را در *S. lividans* تنظیم می‌کند، منجر به بهبود قابل توجه تولید آنتی بیوتیک BGC می‌شوند (Maharjan et al., 2009).

مهندسی ریبوزوم یا RNA پلیمراز

گروه Ochi روشی به نام "مهندسی ریبوزوم" را توسعه دادند که در آن پروتئین ریبوزومی S12 یا RNA پلیمراز (RNAP) برای

این مشاهدات همگی به وضوح اهمیت مولکول‌های کوچک اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیکی را در دستیابی به خوشه‌های ژنی خاموش برای کشف متابولیت‌های جدید نشان می‌دهند.

کشت توام

کشت مشترک به یکی از استراتژی‌های اصلی و موفقیت آمیز برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه جدید از میکروارگانیسم‌ها تبدیل شده است. چندین گزارش در مورد فعل و انفعالات زیستی قارچ‌ها نشان داده که، تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه مرموز را می‌توان با کشت همزمان قارچ‌ها با قارچ‌ها و یا قارچ‌ها با باکتری‌های دیگر القاء کرد. همچنین نشان داده شده که کشت مشترک میکروبی‌ها و برهمکنش‌های مؤثر بین میکروارگانیسم‌های هم‌کشت شده مانند انتقال افقی ژن، جهش‌های ژنی، فعل و انفعالات فیزیکی سلول به سلول و تولید آنزیم‌ها، می‌تواند به کشف متابولیت‌های ثانویه مرموز و ضعیف کمک کند. با این حال، یافتن شرکای مناسب برای کشت مشترک همچنان چالش برانگیز است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای دیده شد که کشت همزمان *Aspergillus fumigatus* با باکتری، پس از افزودن یک تعدیل‌کننده اپی‌ژنتیکی منجر به فعال شدن یک مسیر خاموش سنتز متابولیت ثانویه شد (Moody, 2014).

مورد دیگر پستالون (*Pestalotia*)، یک آنتی‌بیوتیک قوی علیه *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin*) و *Enterococcus faecium* مقاوم به وانکومایسین (*Vancomycin*) است (Cueto et al., 2001) که محصول کشت مشترک جلبک قهوه‌ای *Pestalotia* sp. CNL-365 و یک باکتری ناشناخته می‌باشد (Xu et al., 2023). همچنین گزارش شده که *Bacillus subtilis* باعث القاء ماکروکارپون، ۲-کربوکسی متیل آمینو بنزوئیک اسید و سیتروایزوکومارینول (*macrocarpon*، ۲-*carboxymethylamino benzoic acid*) در *Fusarium tricinctum* می‌شود (Ola et al., 2013).

شرایط محیط کشت

دما

دما یکی از مهم‌ترین عوامل موثر بر رشد، اسپورزایی و بقای میکروارگانیسم‌ها است. در دمای بهینه معین، میکروارگانیسم‌ها به طور طبیعی رشد کرده و آنتی‌بیوتیک تولید می‌کنند، شوک حرارتی باعث تولید جادومایسین (*Jadomycin*) و افزایش بازده والیدامایسین (*validamycin*) می‌شود، در حالی که محدودیت

(Waldron et al., 2001)، مثال دیگر، پروتئین گیرنده AMP حلقوی (*Crp*) است، که تولید آنتی‌بیوتیک را در *Streptomyces* تنظیم می‌کند. بیان بیش از حد *Crp* منجر به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید در گونه‌های *Streptomyces* شده است. از سوی دیگر، غیرفعال شدن پروتئین‌های سرکوبگر (پروتئین‌های رونویسی که در تنظیم منفی نقش دارند) نیز برای فعال کردن خوشه‌های ژنی آنتی‌بیوتیک‌های خاموش مشاهده شده است که بهترین مثال در این دسته، تولید *ursolic acid* مرموز در *Aspergillus nidulans* است (Bok et al., 2013).

بازآرایی کروماتین

گزارش شده که خوشه‌های ژنی فرضی برای سنتز آنتی‌بیوتیک در نواحی دیستال کروموزوم ژنوم‌های قارچی وجود دارند. این مناطق معمولاً در حالت هتروکروماتین هستند و بیان آن‌ها نیاز به کنترل اپی‌ژنتیکی دارد. Bok and Keller (2004) روشی به نام بازسازی کروماتین را برای القاء ژن‌های متابولیت‌های ثانویه در میکروارگانیسم‌ها ایجاد کردند. آنها در حین بررسی مسیر تنظیمی استریگماتوسیستین (*Sterigmatocystin*) سمی در *Aspergillus nidulans*، چندین سویه جهش یافته را شناسایی کردند که تولید سرکوب شده سم را نشان می‌دادند. در این مطالعه، جهش در *LaeA* (متیل ترانسفراز)، که در تنظیم تولید *Sterigmatocystin* نقش دارد شناسایی شد. علاوه بر این مشخص شد که حذف *LaeA* بیان چندین خوشه ژن بیوسنتزی را مسدود می‌کند، در حالی که بیان بیش از حد آن باعث تولید *Penicillin* و *Lovastatin* می‌شود.

همچنین حذف *hdaA* (هیستون داستیلاز) در *Aspergillus* منجر به افزایش تولید محصول دو خوشه ژن متابولیت ثانویه واقع در ناحیه پروگزیمال تلومر شد، اما رونویسی یک خوشه دیگر در ناحیه تلومر-دیستال بدون تغییر باقی ماند (Shwab et al., 2007). همچنین به طور مشابه، ۱۲ قارچ در مواجهه با غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های هیستون داستیلاز قرار گرفتند و ۱۱ سویه با افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع انتخاب شدند (Shwab et al., 2014).

در مطالعه‌ای دیگر Oberlies et al. (2012) از بازدارنده پروتئازوم بورتزومیب (*Bortezomib proteasome*) برای القاء یک قارچ رشته‌ای در جهت تولید متابولیت‌های مرموز استفاده کردند (Moore et al., 2012).

ترکیبات محیط کشت

به طور کلی، منابع کربن و نیتروژن اجزای اصلی در محیط کشت هستند. منبع کربن نه تنها اساس ساخت زیست توده را فراهم می‌کند و منبع انرژی برای همه هتروتروف‌ها است، بلکه واحدهای کربن را برای ساخت متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهد.

منبع نیتروژن برای سنتز پروتئین‌های ضروری و اسیدهای نوکلئیک مورد نیاز است، همچنین واحدهای نیتروژن (N) برای ساخت متابولیت‌های ثانویه نیز مورد نیاز است. نوع منابع کربن و نیتروژن مورد استفاده، تأثیر قابل توجهی بر متابولیسم ثانویه میکروبی دارند. علاوه بر این، نسبت کربن به نیتروژن، یکی از عوامل مهمی است که بر القاء متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد. مصرف اجزای محیط مبتنی بر کربن و نیتروژن، می‌تواند با تشکیل اسیدهای آلی یا تجمع آمونیم بازی، تا حد زیادی بر pH محیط کشت تأثیر بگذارد. بنابراین، میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های حاوی اجزای مختلف ممکن است متابولیسم متفاوتی را نشان دهند و مجموعه‌های خاصی از ژن‌های بیوسنتزی را بیان کنند که بیوسنتز متفاوتی از متابولیت‌های خاص را ایجاد می‌کند (Dinarvand et al., 2013).

در مطالعه‌ای دیده شد که یک سویه قارچ *F. tricinctum* جدا شده از منطقه Beni-Mellal، روی محیط کشت جامد برنج همراه با آب‌میوه و سبزیجات، توانست سه نوع متابولیت فوزاریلین (fusarielin) جدید تولید کند. اما این متابولیت‌ها هنگام کشت در محیط برنج معمولی بدون آب‌میوه و سبزیجات شناسایی نشدند (Hemphill et al., 2017).

همچنین یک دیکتوپپی پرازین (diketopiperazine) جدید از *Eurotium rubrum* MPUC136 کشت شده در محیط کشت بر پایه گندم جدا شد، که زیست فعالی قوی‌تری نسبت به محیط Czapek-Dox آگار نشان داد (Kamauchi et al., 2016).

قارچ ریزوسفری به نام *Paraphaeosphaeria quadriseptata* یک پلی‌کتید شناخته شده با نام مونوسیلین I (Monocillin I) را همراه با چندین آنالوگ هنگامی که در محیط PDA (potato dexteros agar) تهیه شده با آب شیر انکوبه شد، تولید کرد. با این حال، همان سویه قارچی می‌تواند شش لاکتون تری‌هیدروکسی بنزن جدید به نام سیتوسپورون‌های F-I (Cytoporons F-I) را زمانی که محیط کشت با آب مقطر تهیه شده تولید کند (Wijeratne et al., 2004).

مواد مغذی مانند آلانین و یا شوک pH اسیدی، منجر به تولید متیلنومایسین (methylenomycin) در *S. coelicolor* می‌شود (Feller et al., 1994). دمایی که برای رشد استفاده می‌شود، هم بر سرعت تکثیر سلولی و هم بر متابولیسم ثانویه تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، *Arthrinium saccharicola* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس سریعتر رشد می‌کند، اما تولید متابولیت‌های ثانویه آن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در بالاترین مقدار است (Cui et al., 1996). تولید آنتی‌بیوتیک antiMRSA توسط *P. piscicida* PG-02 در هفت دمای مختلف آزمایش شد و نتایج نشان داد که حداکثر مقدار آنتی‌بیوتیک در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تولید می‌شود (Darabpour et al., 2012).

شوری (نمک NaCl)

مقادیر مناسبی از نمک، برای رشد طبیعی میکروب‌ها مورد نیاز است. فشار اسمزی بالا سلول‌ها را کم آب می‌کند و بر واکنش‌های بیوشیمیایی میکروبی تأثیر می‌گذارد. میکروارگانیسم‌هایی که در معرض انواع مختلف محیط‌های تکمیل شده با هالوژن‌های مختلف قرار می‌گیرند، ممکن است مسیر سنتز خود را برای رسیدن به تعادل اسمزی تغییر دهند. بنابراین، خوشه‌های مختلف ژن‌های بیوسنتزی Microbial secondary metabolite (متابولیت ثانویه میکروبی) را فعال می‌کنند (Jensen and Fenical, 1996).

به عنوان مثال، یک اندوفیت با نام *Wallemia sebi* PXP-89 که در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد NaCl کشت داده شد آلکالوئید سیکلوپنتانول پیریدین (Cyclo pentanol pyridine) (alkaloid) جدیدی را تولید کرد که در محیط فاقد نمک شناسایی نشده بود (Peng et al., 2011). همچنین، هنگامی که *Spicaria elegans* 03 در محیط حاوی ۱۰ درصد نمک دریا کشت داده شد، یک اسید دیاکریلیک (Diacyrylic acid) ضد میکروبی جدید را بیوسنتز کرد (Wang et al., 2011).

غلظت اکسیژن

تغییرات در عرضه اکسیژن می‌تواند بر واکنش‌های بیوشیمیایی و فعال کردن خوشه‌های ژن‌های عملکردی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف تأثیر بگذارد. به عنوان مثال آسپیرون (aspyrone) با افزایش غلظت اکسیژن محلول در طی تخمیر *A. ochraceus* DSM-7428، تولید می‌شود (Fuchser et al., 1995).

عناصر خاکی کمیاب و یون‌های فلزی

عناصر خاکی کمیاب نه تنها در فعال کردن ژن‌های مرموز موثر هستند، بلکه در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها نیز نقش دارند. عناصر خاکی کمیاب شامل اسکاندیم، ایتیریم و لانتانیدها (Scandium, yttrium and lanthanides) هستند. محیط کشت حاوی ۱۰۰- میکرومولار اسکاندیم یا لانتانیم، تولید آنتی‌بیوتیک را در *Streptomyces sp.* افزایش می‌دهد. در واقع شواهد نشان دهنده این است که تاثیر اسکاندیم در القاء تولید آنتی‌بیوتیک در *S. Coelicolor* در سطح رونویسی ژن *act II-ORF4* است (Inaoka and Ochi, 2011, Kawai et al., 2007).

تولید آنتی‌بیوتیک در محیط کشت حاوی غلظت‌های پایین اسکاندیم نشان می‌دهد که این عنصر می‌تواند یک عامل مهم برای القاء تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین رنگدانه‌ها، سموم و آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. عناصر خاکی کمیاب در تمام اکوسیستم، در سطوح پایین توزیع شده‌اند و این امکان وجود دارد که میکروبی‌ها، توانایی واکنش به این سطوح پایین از عناصر را برای القاء خوشه‌های ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها در طول دوره تکامل به دست آورده باشند. افزودن اسکاندیم به محیط کشت *B. subtilis* برای افزایش تولید α -آمیلاز (α -amylase) و باسیلیسین (Bacilysin) گزارش شده‌است. مزیت اصلی استفاده از عناصر خاکی کمیاب در محیط‌های کشت برای افزایش تولید آنتی‌بیوتیک این است که، این رویکرد به دانش قبلی در رابطه با مهندسی ژنتیک نیاز ندارد (Inaoka and Ochi, 2011).

سیدروفورها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط باکتری‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. سیدروفورهای گیاهی فیتوسیدروفور نامیده می‌شوند. این مواد می‌توانند جذب آهن را که یک ریز مغذی ضروری است افزایش دهند. سیدروفورها نه تنها در تامین مواد مغذی ضروری مانند آهن نقش دارند بلکه در شرایط تنش نیز به گیاهان کمک می‌کنند. همچنین، در سم زدایی خاک از فلزات سنگین نیز برای آنها نقشی در نظر گرفته شده است. به عنوان مثال سیدروفورها می‌توانند به چندین فلز مانند Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} , Cr^{+3} متصل شوند (Ma et al., 2016).

گزارش شده که در غیاب گیاهان، فلزات می‌توانند تولید سیدروفور را در باکتری‌های مختلف تحریک کنند. این مسئله نشان دهنده ظرفیت بالای باکتری‌ها برای مقاومت در برابر استرس فلزی است (Fashola et al., 2016). از طرفی گلوکز و سرب نیز موجب تحریک تولید سیدروفور در برخی از باکتری‌ها مانند *Bacillus sp.* PZ-1 می‌شود (Zloch et al., 2016).

(Rajkumar et al., 2010) که باید در طراحی محیط کشت برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید در نظر گرفته شود. دسته دیگری از متابولیت‌های ثانویه که در سم زدایی فلزات سنگین نقش دارند متالوتیونین‌ها (Metallothionein) هستند که توسط طیف وسیعی از موجودات از جمله گیاهان و باکتری‌ها تولید می‌شوند. آن‌ها پروتئین‌های کوچک غنی از سیستئین هستند، که ظرفیت اتصال فلزی بالایی دارند و در واقع در سم زدایی و ذخیره فلزات نقش دارند. تولید Metallothionein توسط فلزات سنگینی مانند Cd, Zn, Pb, Cu و Cd تحریک می‌شود. Metallothionein‌های باکتریایی متعددی همراه با مسیرهای ژنتیکی آن‌ها در باکتری‌های مختلف شناسایی شده است. تفاوت زیاد آنها در توالی‌های آمینواسیدی، نشان دهنده تنوع بالای مسیرهای تکامل این مواد است، با این حال، بسیاری از Metallothionein‌ها هنوز ناشناخته هستند و تحقیقات بیشتر، مولکول‌های دیگری را آشکار خواهد کرد. از آنجا که متالوتیونین‌های باکتریایی می‌توانند جذب فلزات را افزایش داده و سمیت آنها را کاهش دهند، می‌توانند راه حلی کارآمد برای بهبود زیست پالایی فلزات سنگین باشند (Chatterjee et al., 2020; Rono et al., 2021).

مولکول‌های کوچک و محرک شیمیایی

در *S. coelicolor*، یک آبشار سیگنالینگ (پیام رسانی) متشکل از N-استیل گلوکزآمین (N-acetylglucosamine) (جزء دیواره سلولی باکتری) و ژن تنظیم کننده DasR می‌تواند تولید آنتی‌بیوتیک را فعال کند. غلظت بالای N-acetylglucosamine باعث تولید آنتی‌بیوتیک در شرایط رشد با مواد مغذی ضعیف می‌شود. این ماده به محل اتصال خود یعنی DasR متصل می‌شود و به عنوان لیگاند میل پروتئین را به DNA کاهش می‌دهد (Rigali et al., 2008). به نظر می‌رسد یک پروتئین دیگر، AtrA، با داشتن اثرات مخالف در مسیر سیگنالینگ، با DasR مقابله می‌کند، DasR همچنین تولید سیدروفور را کنترل می‌کند (Nothaft et al., 2010).

رونویسی افزایش یافته از خوشه‌های بیوسنتزی آنتی‌بیوتیکی مرموز (act, cda, red و cpk) در جهش DasR باکتری *S. coelicolor* مشاهده شده است. بیان DasR با القاء ژن‌های آنتی‌بیوتیک در بسیاری از اکتینومیست‌ها مرتبط است، مشروط بر اینکه از N-acetylglucosamine به عنوان منبع کربن استفاده شود (Rigali et al., 2008).

نتیجه‌گیری

توانایی رمز کردن طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را دارند؛ اما تحت شرایط رشد استاندارد همه توانایی خود را نشان نمی‌دهند. شناخت این سیستم مرموز و پیدا کردن راه‌هایی برای فعال کردن خوشه‌های ژنی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه ناشناخته جهت دستیابی به این گنجینه بزرگ می‌تواند کمک بزرگی به نیازهای دارویی و دیگر صنایع کند.

در شرایط کنونی و با ظهور بیماری‌های ناشناخته و عفونی، پیدا کردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید بسیار مهم است، همچنین آنزیم‌های جدید و کارآمد در pH متغیر و دمای بالا در بسیاری از صنایع مانند دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی، زیست‌پالایی مورد نیاز است. میکروب‌ها با داشتن ژنوم وسیع و مرموز خود

References

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., Shamsbakhsh, M. (2019). *Streptomyces* strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10:1505.
- Abbasi, S., Spor, A., Sadeghi, A., & Safaie, N. (2021). *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. *Scientific reports*, 11: 9317.
- Abdelwahab, M. F., Kurtán, T., Mándi, A., Müller, W. E., Fouad, M. A., Kamel, M. S., ... & Proksch, P. (2018). Induced secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* through bacterial co-culture and OSMAC approaches. *Tetrahedron Letters*, 59 (27), 2647-2652.
- Ahn, Y. O., Shimizu, B. I., Sakata, K., Gantulga, D., Zhou, Z., Bevan, D. R., & Esen, A. (2010). Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 51 (1), 132-143.
- Akbari, A. R., Gharanjik, S., Koobaz, P., Karimi, E., & Sadeghi, A. (2016). 'Evaluation of Mutual Effect of Ectoine(s) producing *Streptomyces* and wheat at salt conditions', *Crop Biotechnology*, 6 (13), 57-68.
- Buhian, W. P., & Bensmihen, S. (2018). Mini-review: nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in plant science*, 9, 1247.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K.
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3 (7), 619-627.
- Banerjee, G., Ray, A. K., & Kumar, R. (2016). Effect of temperature on lateral gene transfer efficiency of multi-antibiotics resistant bacterium, *Alcaligenes faecalis*. *Sains Malays*, 45, 909-914.
- Bok, J. W., Soukup, A. A., Chadwick, E., Chiang, Y. M., Wang, C. C., & Keller, N. P. (2013). VeA and MvIA repression of the cryptic orsellinic acid gene cluster in *Aspergillus nidulans* involves histone 3 acetylation. *Molecular microbiology*, 89 (5), 963-974.
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, 3 (2), 527-535.
- Cotton, T. A., Pétriacq, P., Cameron, D. D., Meselmani, M. A., Schwarzenbacher, R., Rolfe, S. A., & Ton, J. (2019). Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *The ISME journal*, 13 (7), 1647-1658.
- Chai, Y. J., Cui, C. B., Li, C. W., Wu, C. J., Tian, C. K., & Hua, W. (2012). Activation of the dormant secondary metabolite production by introducing gentamicin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Marine drugs*, 10 (3), 559-582.
- Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2001). Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, 64 (11), 1444-1446.
- Cui, C. B., Kakeya, H., & Osada, H. (1996). Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron*, 52 (39), 12651-12666.
- Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Priyadarshane, M., & Das, S. (2020). Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: Metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, 12 (11), 1637-1655.
- Desurmont, G. A., Harvey, J., van Dam, N. M., Cristescu, S. M., Schiestl, F. P., Cozzolino, S., ... & Turlings, T. C. (2014). Alien interference: disruption of infochemical networks by invasive insect herbivores. *Plant, Cell & Environment*, 37 (8), 1854-1865.
- Darabpour, E. M. R. A., Ardakani, M. R., Motamed, H., Ronagh, M. T., & Najafzadeh, H. (2012). Purification and optimization of production conditions of a marine-derived antibiotic and ultra-structural study on the effect of this antibiotic against MRSA. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 16 (2).
- Dinarvand, M., Rezaee, M., Masomian, M., Jazayeri, S. D., Zareian, M., Abbasi, S., & Ariff, A. B. (2013). Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra-and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *BioMed research international*, 2013.
- Dos Santos, J. D. N., João, S. A., Martín, J., Vicente, F., Reyes, F., & Lage, O. M. (2022). iChip-inspired isolation, bioactivities and Dereplication of Actinomycetota from Portuguese Beach sediments. *Microorganisms*, 10(7), 1471.

- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Zekhnini, Z., Swings, J., & Gerday, C. (1994). Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 41, 477-479.
- Fuchser, J., Thiericke, R., & Zeeck, A. (1995). Biosynthesis of aspinonene, a branched pentaketide produced by *Aspergillus ochraceus*, related to aspyrone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (13), 1663-1666.
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance. *International journal of environmental research and public health*, 13(11), 1047.
- Gebhard, F., & Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1550-1554.
- Hashimoto, M., Hasegawa, H., & Maeda, S. (2019). High temperatures promote cell-to-cell plasmid transformation in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 515(1), 196-200.
- Hemphill, C. F. P., Sureechatchaiyan, P., Kassack, M. U., Orfali, R. S., Lin, W., Daletos, G., & Proksch, P. (2017). OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *The Journal of antibiotics*, 70(6), 726-732.
- Hui, N., Jumpponen, A., Francini, G., Kotze, D. J., Liu, X., Romantschuk, M., ... & Setälä, H. (2017). Soil microbial communities are shaped by vegetation type and park age in cities under cold climate. *Environmental microbiology*, 19(3), 1281-1295.
- Imai, Y., Fujiwara, T., Ochi, K., & Hosaka, T. (2012). Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance. *The Journal of Antibiotics*, 65(6), 323-326.
- Inaoka, T., & Ochi, K. (2011). Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 8181-8183.
- Jensen, P. R., & Fenical, W. (1996). Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *Journal of industrial microbiology*, 17, 346-351.
- Jin, J., Wang, M., Lu, W., Zhang, L., Jiang, Q., Jin, Y., ... & Xiao, M. (2019). Effect of plants and their root exudate on bacterial activities during rhizobacterium-plant remediation of phenol from water. *Environment international*, 127, 114-124.
- Kanchanabanca, C., Hosaka, T., & Kojima, M. (2024). High-intensity green light potentially activates the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Archives of Microbiology*, 206(1), 8.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, 72(1), 1-120.
- Kouroshnia, A., Zeinali, S., Irani, S., & Sadeghi, A. (2022). Induction of apoptosis and cell cycle arrest in colorectal cancer cells by novel anticancer metabolites of *Streptomyces* sp. 801. *Cancer Cell International*, 22, 235.
- Kudjordjie, E. N., Sapkota, R., Steffensen, S. K., Fomsgaard, I. S., & Nicolaisen, M. (2019). Maize synthesized benzoxazinoids affect the host associated microbiome. *Microbiome*, 7(1), 1-17.
- Kamauchi, H., Kinoshita, K., Sugita, T., & Koyama, K. (2016). Conditional changes enhanced production of bioactive metabolites of marine derived fungus *Eurotium rubrum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(20), 4911-4914.
- Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., & Ochi, K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS microbiology letters*, 274(2), 311-315.
- Lyu, D., & Smith, D. L. (2022). The root signals in rhizospheric inter-organismal communications. *Frontiers in Plant Science*, 13, 5328.
- Lyu, D., Backer, R., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2020). Phytomicrobiome coordination signals hold potential for climate change-resilient agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 11, 634.
- Lareen, A., Burton, F., & Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant molecular biology*, 90, 575-587.
- Lorenz, M. G., Reipschläger, K., & Wackernagel, W. (1992). Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Archives of microbiology*, 157, 355-360.
- Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G. L., & Aigle, B. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6258-6263.
- Martín-Aragón, V. R., Millán, F. R., Cuadrado, C., Daranas, A. H., Medarde, A. F., & López, J. M. S. (2023). Induction of new aromatic polyketides from the marine actinobacterium *Streptomyces griseorubiginosus* through an OSMAC approach. *Marine Drugs*, 21(10), 526.
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., ... & Scheel, D. (2016). Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Scientific Reports*, 6(1), 29033.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14-25.

- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2018). The chemistry of plant-microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 112.
- Maharjan, S., Oh, T. J., Lee, H. C., & Sohng, J. K. (2009). Identification and functional characterization of an afsR homolog regulatory gene from *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 121-127.
- Maddocks, S. E., & Oyston, P. C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154(12), 3609-3623.
- Moore, J. M., Bradshaw, E., Seipke, R. F., Hutchings, M. I., & McArthur, M. (2012). Use and discovery of chemical elicitors that stimulate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. In *Methods in enzymology* (Vol. 517, pp. 367-385). Academic Press.
- Moody, S. C. (2014). Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 9(5), 575-578.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14-25.
- Middleton, H., Monard, C., Daburon, V., Clostres, E., Tremblay, J., Yergeau, É., & Amrani, A. E. (2022). Plants release miRNAs in the rhizosphere, targeting microbial genes. *BioRxiv*, 2022-07.
- Nothaft, H., Rigali, S., Boomsma, B., Swiatek, M., McDowall, K. J., Van Wezel, G. P., & Titgemeyer, F. (2010). The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Molecular microbiology*, 75(5), 1133-1144.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., ... & Epstein, S. (2010). Use of iChip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Applied and environmental microbiology*, 76(8), 2445-2450.
- Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., & Kurosawa, K. (2004). Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Advances in applied microbiology*, 56(56), 155-179.
- Ola A. R., Thomy D., Lai D., Brotz-Oesterhelt H., & Proksch P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 76(11):2094-2099
- Piddock, L. J. (2015). Teixobactin, the first of a new class of antibiotics discovered by iChip technology?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), 2679-2680.
- Peng, X. P., Wang, Y., Liu, P. P., Hong, K., Chen, H., Yin, X., & Zhu, W. M. (2011). Aromatic compounds from the halotolerant fungal strain of *Wallemia sebi* PXP-89 in a hypersaline medium. *Archives of pharmacological research*, 34, 907-912.
- Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature reviews microbiology*, 13(8), 509-523.
- Ross, A. C., Gulland, L. E., Dorrestein, P. C., & Moore, B. S. (2015). Targeted capture and heterologous expression of the *Pseudoalteromonas* alterochromide gene cluster in *Escherichia coli* represents a promising natural product exploratory platform. *ACS synthetic biology*, 4(4), 414-420.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142-149.
- Rono, J. K., Le Wang, L., Wu, X. C., Cao, H. W., Zhao, Y. N., Khan, I. U., & Yang, Z. M. (2021). Identification of a new function of metallothionein-like gene OsMT1e for cadmium detoxification and potential phytoremediation. *Chemosphere*, 265, 129136.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & Van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), 670-675.
- Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E., & Akbari, A. R. (2017). Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl*, 62, 805-819.
- Sheng, L., Zhao, W., Yang, X., Mao, H., & Zhu, S. (2023). Response characteristics of rhizosphere microbial community and metabolites of *Iris tectorum* to Cr stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115218.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., ... & Pieterse, C. M. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(22), E5213-E5222.
- Stewart, G. J. (1989). The mechanism of natural transformation. In "Gene Transfer in the Environment." (Levy, SB, and Miller, RV eds.).
- Shao, Z., Rao, G., Li, C., Abil, Z., Luo, Y., & Zhao, H. (2013). Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold. *ACS synthetic biology*, 2(11), 662-669.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., & Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic cell*, 6(9), 1656-1664.
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., & Pichersky, E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 42(5), 757-771.

- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64, 15-22.
- van Wezel, G. P., & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports*, 28(7), 1311-1333.
- Van Deynze, A., Zamora, P., Delaux, P. M., Heitmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., ... & Bennett, A. B. (2018). Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLoS biology*, 16(8), e2006352.
- Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 187-198.
- VanderMolen, K. M., Darveaux, B. A., Chen, W. L., Swanson, S. M., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2014). Epigenetic manipulation of a filamentous fungus by the proteasome-inhibitor bortezomib induces the production of an additional secondary metabolite. *RSC advances*, 4(35), 18329-18335.
- Wu, L., Weston, L. A., Zhu, S., & Zhou, X. (2023). Rhizosphere Interactions: Root Exudates and Rhizosphere Microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1281010.
- D., ... & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *nature*, 417(6885), 141-147.
- Wang, Y., Kou, S., Jiang, Q., Xu, B., Liu, X., Xiao, J., ... & Xiao, M. (2014). Factors affecting transfer of degradative plasmids between bacteria in soils. *Applied soil ecology*, 84, 254-261.
- Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, P. R., Broughton, M. C., Turner, J., Madduri, K., ... & Baltz, R. H. (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa* 1. *Chemistry & biology*, 8(5), 487-499.
- Wang, F. Z., Wei, H. J., Zhu, T. J., Li, D. H., Lin, Z. J., & Gu, Q. Q. (2011). Three new cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* kla03 by supplementing the cultures with L- and D-tryptophan. *Chemistry & Biodiversity*, 8(5), 887-894.
- Wijeratne, E. K., Carbonezi, C. A., Takahashi, J. A., Seliga, C. J., Turbyville, T. J., Pierson, E. E., ... & Gunatilaka, A. L. (2004). Isolation, optimization of production and structure-activity relationship studies of monocillin I, the cytotoxic constituent of *Paraphaeosphaeria quadrisepitata*. *The Journal of Antibiotics*, 57(8), 541-546.
- Wang, Y., Kou, S., Jiang, Q., Xu, B., Liu, X., Xiao, J., ... & Xiao, M. (2014). Factors affecting transfer of degradative plasmids between bacteria in soils. *Applied soil ecology*, 84, 254-261.
- Zhao, M., Zhao, J., Yuan, J., Hale, L., Wen, T., Huang, Q., ... & Shen, Q. (2021). Root exudates drive soil-microbe-nutrient feedbacks in response to plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 44(2), 613-628.
- Zeng, H., Xu, H., Liu, G., Wei, Y., Zhang, J., & Shi, H. (2021). Physiological and metagenomic strategies uncover the rhizosphere bacterial microbiome succession underlying three common environmental stresses in cassava. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 125143.
- Złoch, M., Thiem, D., Gadzała-Kopciuch, R., & Hryniewicz, K. (2016). Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd²⁺. *Chemosphere*, 156, 312-325.
- Xu, S., Li, M., Hu, Z., Shao, Y., Ying, J., & Zhang, H. (2023). The potential use of fungal co-culture strategy for discovery of new secondary metabolites. *Microorganisms*, 11, 464.

ORIGINAL ARTICLE

Grouping of Medicinal Pecan Plant Ecotypes (*Peganum harmala* L.) Based on Biochemical Traits in Hamadan and Kermanshah Provinces

Leila Akbari^{1*}, Mehdi Kakaei²

¹Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Engineering Sciences, Razi University Agriculture and Natural Resources Campus, Kermanshah, Iran.

²Faculty of Engineering, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence

Leila Akbari

Email: L.akbari@razi.ac.ir

How to cite

Akbari, L., & Kakaei, M. (2024). Grouping of Medicinal Pecan Plant Ecotypes (*Peganum harmala* L.) Based on Biochemical Traits in Hamadan and Kermanshah Provinces. *Crop Biotechnology*, 13(46), 33-44.

ABSTRACT

The most valuable products obtained from the (*Peganum harmala* L.) are phenolic compounds and other biochemical contents, which widely is used in treating of many diseases. This study has been done with the goal of evaluating the effect of different habitats on some biochemical and physiological parameters in pecan plant. First, the samples were identified and collected simultaneously in the four studied habitats. A factorial experiment with a completely randomized design with three replications was conducted in the central laboratory of Razi University in 2023. Results of the analysis of the variance of the studied traits has been showed, that there is a significant difference between the ecotypes and also the two leaf and seed samples in the characteristics of total chlorophyll content, soluble sugar, flavonoid and anthocyanin. The results showed that, there is a significant difference between the ecotype and the sample in chlorophyll b index. The difference between the samples is due to the type of ecotype and the effect of the environment. There is a significant positive correlation between chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll. Phenol and flavonoid content showed significant negative correlation with total chlorophyll and positive and significant correlation with anthocyanin. Considering the content of biochemical compounds and the high content of phenols and flavonoids as antioxidant compounds in the studied samples, it can be stated that Ecotype No. 2 can be introduced to researchers as a suitable sample for further studies in the pharmaceutical field. The authors are grateful for the cooperation of the director of the Faculty of Engineering Sciences and Natural Resources, Razi University.

KEYWORDS

Anthocyanin, Chlorophyll, Genetic diversity, Flavonoid, Habitat, Total phenol.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *Peganum harmala* L. بر اساس مارکرهای بیوشیمیایی در چهار رویشگاه مختلف استان همدان و کرمانشاه

لیلا اکبری^{۱*}، مهدی کاکایی^۲

چکیده

با ارزش‌ترین فرآورده‌های بدست آمده از گیاه اسپند ترکیبات فنلی و سایر محتوای بیوشیمیایی می‌باشد که در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد وسیعی دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر رویشگاه‌های مختلف بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی در گیاه اسپند صورت پذیرفت. ابتدا نمونه‌ها به طور هم‌زمان در چهار رویشگاه مورد مطالعه شناسایی و جمع‌آوری شدند. آزمایشی به صورت فاکتوریل، فاکتور اول اکوتیپ‌ها در چهار سطح و فاکتور دوم نمونه در دو سطح در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رازی در سال ۱۴۰۲ اجرا گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که در صفات محتوای کلروفیل کل، فنل کل، فلاوونوئید و آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها و همچنین دو نمونه برگ و دانه وجود دارد. در بررسی اثر متقابل اکوتیپ در نمونه نیز نتایج حاکی از معنی‌دار بودن شاخص کلروفیل b و قند محلول می‌باشد. اختلاف بین نمونه‌ها می‌تواند ناشی از نوع اکوتیپ و عوامل محیطی باشد. در بررسی و تعیین همبستگی بین صفات مورد بررسی نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل مشاهده گردید. محتوای فنل و فلاوونوئید نیز دارای همبستگی منفی و معنی‌دار با کلروفیل کل و همبستگی مثبت و معنی‌دار با آنتوسیانین را نشان دادند. در نمونه‌های مورد بررسی با توجه به محتوای ترکیبات بیوشیمیایی و نیز محتوای بالای فنل‌ها و فلاوونوئیدها و همچنین اهمیت این گیاه دارویی با ارزش به واسطه دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهم می‌توان بیان داشت که اکوتیپ شماره ۲ می‌تواند به عنوان یک نمونه مناسب جهت مطالعات گسترده‌تر در حوزه کشت، دارویی و درمان به پژوهشگران معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین، تنوع ژنتیکی، رویشگاه، فنل کل، فلاوونوئید، کلروفیل.

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم مهندسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
^۲دانشکده فنی مهندسی، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

لیلا اکبری

رایانامه: L.akbari@razi.ac.ir

استناد به این مقاله:

اکبری، لیلا و کاکایی، مهدی (۱۴۰۳). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه اسپند (*Peganum harmala* L.) بر اساس مارکرهای بیوشیمیایی در چهار رویشگاه مختلف استان همدان و کرمانشاه. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۳۳-۴۴.

مقدمه

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و نحوه مدیریت و استفاده از آن برای دسترسی به مجموعه های ژنتیکی در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی از ضروریات پایه‌ای هر برنامه اصلاحی است. شناخت تنوع ژنتیکی درون و بین ژرم پلاسما ها و کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی موجود در بین و درون افراد و جمعیت ها امکان نمونه گیری، ارزیابی، سازماندهی و حفاظت ژرم پلاسما را بطور مؤثرتری فراهم می سازد. بلندی‌های زاگرس و هم‌چنین تنوع اقلیمی بالا به دلیل ارتفاعات و دشت‌های پهن سبب ایجاد تنوع اقلیمی وسیعی در این اکوسیستم شده و همین امر نیز سبب حضور تنوع قابل توجهی از گیاهان در این مناطق شده است. بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان همواره از طریق صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی همواره متداول بوده است (ال باکاتوشی و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به اهمیت گیاهان داروئی به عنوان ذخایر ژنتیکی ارزشمند در صورت استفاده بیش از حد به عنوان منابعی زنده و جبران‌ناپذیر تمام شدنی و اگر با دقت و خردمندی استفاده شوند پایدار خواهند بود. اهمیت گیاهان داروئی در گذشته نادیده گرفته شده است. در حال حاضر به عنوان یک منبع مقرون به صرفه در سیستم بهداشتی و مراقبتی و هم‌چنین به عنوان منبعی برای درآمد محسوب می‌شوند. جنس اسپند شامل چهار گونه است که به طور گسترده در مناطق معتدل گرم تا نیمه گرمسیری از مدیترانه تا مغولستان و هم‌چنین مناطق خاصی از آمریکا پراکنده شده است. در میان این گونه‌ها، گونه (*Peganum harmala* L.) از منطقه مدیترانه تا آسیای مرکزی پراکندگی دارد. (ابراهیمی و زرین‌پنجه، ۲۰۱۵)

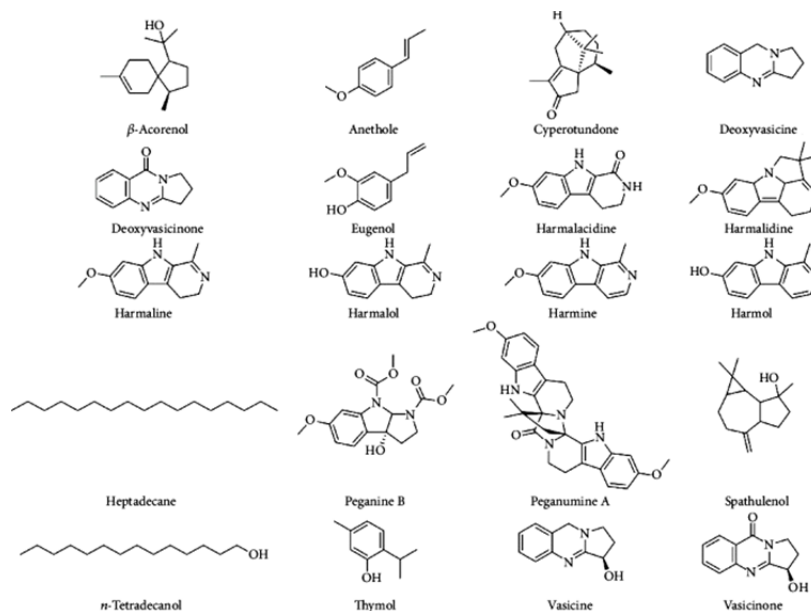
گیاه اسپند بومی منطقه مدیترانه شرقی، گیاهی چندساله و متعلق به خانواده Zygophyllaceae است. در مناطق پلکانی، استپی، خاک‌های سردم‌نی و شرایط نیمه‌خشک به طور خود به خودی رشد می‌کند. درختچه‌ای به ارتفاع ۰/۳ - ۰/۸ متر با گل‌های سفید، ریشه‌های خزنده کوتاه، کپسول های دانه گرد با بیش از ۵۰ دانه است. این گیاه به طور گسترده‌ای به عنوان یک گیاه داروئی در خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیای مرکزی توزیع و مورد استفاده قرار می‌گیرد (فریسون و همکاران، ۲۰۱۱؛ وانترب و رنز د کراینی، ۲۰۰۸). این گیاه در ایران به طور سنتی به عنوان یک ضدعفونی کننده استفاده می‌شده است و با سوزاندن دانه‌های آن عامل ضدعفونی کننده به دست می‌آید (آرشاد و همکاران،

۲۰۰۸؛ فتحی زاده و همکاران، ۲۰۰۶). پروفایل فیتوشیمیایی، کاربرد سنتی توسط مردم کاربرد داروئی و کلینیکی این گیاه داروئی به خوبی شناخته شده است. این گیاه برای درمان انواع بیماری‌های انسان مانند آسم، یرقان، قولنج و غیره مورد توجه قرار گرفته است (بوخاری و همکاران، ۲۰۰۸). اسپند به علت دارا بودن ترکیبات آلکالوئیدهایی نظیر، هارمین، هارمالین و هارمالول مورد توجه خاص محققین می‌باشد (شکل ۱). تاکنون مطالعات فراوانی روی جنبه‌های مختلف اسپند انجام گرفته است. آلکالوئید هارمالا بیشتر در دانه، کپسول و ریشه‌ها و به میزان ۲ تا ۷ درصد وزن خشک یافت می‌شود (فریسون و همکاران، ۲۰۰۸). فارماکولوژیک‌ترین ترکیبات فعال *Peganum harmala* چندین آلکالوئید هستند که در دانه ها و ریشه‌ها یافت می‌شوند. گزارش شده است که این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی است. مجموعه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را گیاهان داروئی تولید می‌کنند که این مواد در موارد متعددی به عنوان مکانیسم‌های دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌ها، حشرات و گیاه‌خواران عمل می‌کنند (میرجانا و همکاران، ۲۰۰۴). اندام‌های مختلف یک گیاه داروئی دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات شیمیایی هستند. از طرف دیگر، عکس‌العمل گونه‌های مختلف نسبت به غلظت‌های مختلف عصاره اندام‌های گیاهی متفاوت می‌باشد. در تمامی گیاهان میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آن‌ها دارد. در بسیاری از گیاهان کوئرستین، یک فلاونوئید طبیعی و بدون گلیکوزید است. فلاونوئید بدون گلیکوزید نسبت به فلاونوئید گلیکوزیددار آنتی‌اکسیدان قوی‌تری است. بسیاری از مطالعات حاکی از اثر آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی ماده کوئرستین است (محمدی سانی و ابراهیمی، ۲۰۱۵). آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد یا ممانعت از تشکیل آن‌ها، سبب حفظ سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شوند (جوئی و همکاران، ۲۰۱۵). مکانیسم ترکیبات فنلی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد است به طوری که غلظت این بیومولکول‌ها پس از مواجهه گیاه با تنش به سرعت افزایش و شرایط پاسخ به تنش را در گیاه تعدیل می‌کند (فیگوئی روا و همکاران، ۲۰۱۶). وظایف مختلف ترکیبات فنلی در گیاه شامل: ماده رنگی در گیاهان، خواص ضد بیماری و آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتری و آفت کش طبیعی، عامل حفاظت گیاه در برابر امواج ماوراء بنفش، عامل عایق‌بندی

(۲۰۰۷). در تحقیقی میزان فنل کل حاصل از عصاره آبی و الکلی گیاه اسپند مورد بررسی قرار گرفته است که میزان فنل کل به ترتیب ۱۰/۹ و ۸/۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک گیاه گزارش شده است (تواها خالد و همکاران، ۲۰۰۷).

در نتایج حاصل از بررسی صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های گیاه آقطی جمع‌آوری شده در مناطق مختلف شمال کشور نشان داده شده است که عامل ارتفاع بر میزان متابولیت‌های ثانویه مؤثر بوده است. به طوری که با افزایش ارتفاع از سطح دریا، میزان فنل و فلاونوئید در اندام برگ روند کاهشی داشته است در حالی که در سایر بخش‌های گیاه این روند افزایشی بوده است. همچنین در بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش ارتفاع میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش نشان داده است. وجود اختلاف معنی‌دار در اندام‌های مختلف گیاه آقطی و همچنین مناطق مختلف نمونه‌برداری بیانگر آن است که میزان فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میوه و برگ بیشتر از اندام‌های ساقه و ریشه است (پولکی خشکردی و همکاران، ۲۰۲۳). در بررسی تأثیر ارتفاع و روشگاه گیاهی بر میزان فلاونوئید و ترکیبات فنلی کل در گیاهان آقطی، گزنه، گل‌گاوزبان، علف‌مار و گل‌راعی بیان داشتند که بیشترین میزان بیان را علف‌مار داشته است که بیشترین میزان ترکیبات مؤثره این گیاهان در ارتفاعات مشاهده شده است که نتایج تحقیق حاضر در تأثیر ارتفاع بر میزان فنل، فلاونوئید و سایر ترکیبات مؤثره در اندام‌های ساقه، برگ و میوه اسپند مشابه بوده است (قنبری و همکاران، ۲۰۲۲).

کننده دیواره سلولی گیاهی در برابر گازها (شهیدی و نرکی، ۲۰۰۴). در گیاهان، یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان طبیعی فلاونوئیدها است (قریبی و همکاران، ۲۰۱۵)، جزو بزرگترین گروه فنل‌های گیاهی و از ۸۰۰۰ ترکیبات فنلی طبیعی موجود تقریباً بیش از نیمی از آن‌ها را شامل می‌شوند. افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی ارتباط دارد. به طوری که فلاونوئیدها به طور مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید و هیدروکسیل می‌گردد (شارما و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی نیز آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که در آب به صورت محلول بوده و در سطح وسیعی در مایع سلولی گیاه وجود دارند. این رنگدانه‌های فلاونوئیدی مسئول رنگ‌های مختلف در میوه‌ها، گل‌ها و سبزیجات هستند. آنتوسیانین‌ها توانایی جذب رادیکال‌های آزاد در بدن موجودات زنده را دارند (بوچرت و همکاران، ۲۰۰۵). از جمله مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر رشد و عملکرد گیاهان ارتفاع از سطح دریا است. در اثر تغییر ارتفاع تغییرات دمایی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در تغییرات ارتفاع رویش گیاه است. به طوری که با افزایش و یا کاهش ارتفاع عواملی مانند رطوبت نسبی، میزان آب در دسترس و حتی میزان تابش نور دریافتی برای گیاه نیز تغییر می‌کند (فیل کچ و همکاران، ۲۰۱۲). عصاره نعناع (*Mentha spicata*, L.) با دارا بودن محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را در مطالعات مختلف از خود نشان داده است (سوئیتی و همکاران،



شکل ۱. ترکیبات فیتوشیمیایی جدا شده از گونه‌های مختلف اسپند (شریفی را و همکاران، ۲۰۲۱)

ارزیابی‌های آزمایشگاهی

آزمایش به صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۴۰۲ انجام شد. در این بررسی فاکتور اول اکوتیپ‌ها در چهار سطح (روستای موسی‌آباد دو نمونه، روستای نجف‌آباد و روستای کارخانه) و فاکتور دوم نمونه در دو سطح (دانه و برگ) مورد بررسی قرار گرفتند. اندام‌های هوایی گیاه جمع‌آوری و سپس در دمای اتاق در سایه خشک شدند. قطعات ذکر شده به صورت مجزا آسیاب، پودر و ریز شدند (شکل ۲). جهت تهیه عصاره‌های گیاهی (یک گرم) پودر از هر نمونه با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. جهت استخراج مواد مؤثره گیاهی و سپس حذف ناخالصی‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی آن‌ها جهت تعیین محتوای مواد مؤثره جمع‌آوری گردید. جهت تعیین محتوای فنل کل موجود در عصاره‌ها از معرف (Folin-Ciocalteu) که به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده بود) به ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی افزوده شد. سپس محلول حاصل با ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. در نهایت جذب محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت جهت تعیین محتوای فنل کل برحسب میلی‌گرم اکی والان‌های گالیک اسید در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان گردید (بورداک، ۲۰۱۶). تعیین محتوای فلاونوئید موجود در عصاره‌ها طبق روش جیا و همکاران (جیا و همکاران، ۱۹۹۹) با اندکی تغییر تعیین شد. ۵۰ میکرولیتر عصاره در لوله آزمایش با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و سپس ۰/۰۷۵ میلی‌لیتر نیتريت سدیم پنج درصد به آن اضافه شد، بعد از ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول (کلرید آلومینیوم) ۱۰ درصد اضافه شد و پس از گذشت شش دقیقه ۰/۵ میلی‌لیتر (NaOH) میلی‌لیتر یک مولار اضافه گردید و با آب مقطر حجم نهایی محلول به سه میلی‌لیتر رسانده شد و سپس در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

تعیین محتوای سطوح فنول کل، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها را از دانه‌های اسپند هارملا مورد ارزیابی قرار گرفته است. عصاره دانه‌های *Peganum harmala* از دو مکان مختلف در تونس (Oudref و Djerba) با حلال‌های استخراج متفاوت شامل پترولیوم اتر، کلروفرم، اتیل استات، اتانول و آب به دست آمد. نتایج حاصل از ارزیابی نشان داده است که ترکیب آن‌ها از نظر فنولیک (معادل ۲/۴۸ تا ۷۵/۵۲ گرم بر کیلوگرم اسید گالیک)، آنتوسیانین‌ها (معادل ۰ تا ۲۵/۵۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیانیدین) و فلاونوئیدها (۰ تا ۳/۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم معادل کوئرستین) می‌باشد (چبیر و همکاران، ۲۰۱۴).

در مطالعه عصاره‌های حاصل از نمونه‌های مختلف گیاه اسپند نیز نتایج حاکی از آن بوده است که عصاره‌ها اثر محافظت‌کننده عصبی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد ویروسی را نشان داده‌اند. همچنین در بهبود اختلالات تنفسی (آسم و سرفه)، درماتوز و استوآرتریت زانو نیز مؤثر هستند (شریفی راد و همکاران، ۲۰۱۴).

با توجه به خواص درمانی چند منظوره و استفاده از قسمت‌های مختلف این گیاه این مطالعه با هدف ارائه بینشی در خصوص موقعیت جغرافیایی و تعیین محتوای بیوشیمیایی بین متابولیت‌های ثانویه کپسول و شاخساره چند اکوتیپ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان همدان و کرمانشاه جهت تعیین بهترین اکوتیپ بر اساس محتوای ترکیبات بیوشیمیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی محل جغرافیایی و رویشگاه

در این مطالعه، نمونه‌های گیاهی چهار محل رویش شامل سه مکان در نقاط مختلف اسدآباد (استان همدان) شامل (نمونه اول: روستای موسی‌آباد ۱، نمونه دوم: روستای موسی‌آباد ۲ و نمونه سوم: روستای نجف‌آباد) و نمونه چهارم در شهر کنگاور (استان کرمانشاه) شامل (روستای کارخانه) واقع در بخش غربی ایران ارزیابی گردیدند (جدول ۱). ابتدا نمونه‌های گیاهی اسپند هم‌زمان (اوایل تیرماه ۱۴۰۲) در محل رویشگاه‌های فوق‌الذکر مورد نظر شناسایی و جمع‌آوری گردیدند.

جدول ۱. مشخصات جغرافیایی محل‌های جمع‌آوری اکوتیپ‌های مورد مطالعه

ردیف	محل جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	روستای موسی‌آباد، اسدآباد (همدان)	۴۸/۰۰۸۶	۳۴/۹۹۰۸۸	۱۵۰۰
۲	روستای نجف‌آباد - اسدآباد (همدان)	۴۷/۹۷۶۰	۳۴/۶۵۲۷۹	۱۵۰۰
۳	روستای کارخانه - کنگاور (کرمانشاه)	۴۷/۹۹۷۸	۳۴/۴۹۷۳۰	۱۲۰۰

سانتریفیوژ جدا و درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. دو میلی لیتر از محلول آماده شده به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول فنل پنج درصد به محلول درون فالکون مرحله قبل اضافه و سپس پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ (v/v) به محلول بالا اضافه می‌شود و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید (شیلگل، ۱۹۵۶). تعیین مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با استفاده از روش (لیکتین تالر، ۱۹۸۷) انجام شد (شکل ۳).

ارزیابی‌های آماری

داده‌های حاصل از بررسی صفات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. جهت رسم نمودارها از برنامه اکسل، Graph Pad و HeatMaper استفاده گردید.

محتوای فلاونوئیدی کل بر حسب میلی‌گرم اکی‌والان‌های کوئرستین موجود در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین بیان گردید. جهت محاسبه آنتوسیانین نمونه‌ها، دو صدم گرم از گیاه خشک وزن و با چهار میلی‌لیتر HCL یک درصد در متانول درون هاون چینی سائیده شده و سپس عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال قرار گرفت. پس از ده دقیقه سانتریفیوژ محلول روئی جمع‌آوری و در طول موج های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. میزان آنتوسیانین کل با فرمول زیر محاسبه گردید ($A = A_{530} - (0.25 \times A_{657})$ و به ترتیب نشان‌دهنده میزان آنتوسیانین کل، جذب در طول موج ۵۳۰ و جذب در طول موج ۶۵۷ نانومتر است (مایتا و همکاران، ۱۹۹۷). در تعیین محتوای قند کل نیز ۰/۲ گرم از نمونه تر وزن، در ازت مایع پودر و سپس درون تیوب دو میلی‌لیتری ریخته شده و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد روی هر نمونه اضافه می‌شود و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی حاصل از



شکل ۲. تصویر نمونه‌های مورد مطالعه (برگ و دانه) در اسپند

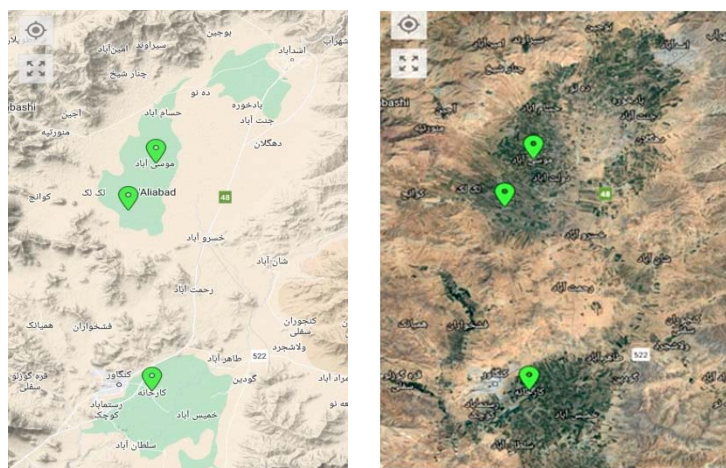


شکل ۳. تهیه عصاره حاصل از پودر نمونه‌ها و آماده سازی جهت قرائت صفات مورد بررسی در اکوتیپ‌های اسپند

نتایج

نتایج حاصل از بررسی موقعیت جغرافیائی چهار اکوتیپ مورد بررسی با استفاده از نقشه ماهواره ای نشان داد که با توجه به طول، عرض جغرافیائی و ارتفاع از سطح دریا، این اکوتیپ‌ها در یک طول جغرافیائی، عرض‌های مختلف جغرافیائی و با توجه به مناطق ارتفاع از سطح دریا نیز در آن‌ها متفاوت است (شکل ۴). به دلیل اینکه در عرض‌های جغرافیائی متفاوت قرار دارند محتوای ترکیبات بیوشیمیائی آن‌ها نیز متفاوت است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نتایج

نشان داد که در صفات محتوای کلروفیل کل، فلاوونوئید و آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها و هم‌چنین دو نمونه برگ و دانه وجود دارد و در بررسی اثر متقابل نیز نتایج نشان داده است که شاخص کلروفیل b و محتوای قند محلول معنی‌دار است (جدول ۲). اختلاف بین نمونه‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در اکوتیپ و اثر محیط باشد. در نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات اصلی مورد بررسی در بین اکوتیپ‌ها نیز، بیشترین محتوای فنل کل مربوط به نمونه‌های موسی‌آباد ۱ و ۲، نجف‌آباد و سپس روستای کارخانه بوده است.



شکل ۴. موقعیت اکوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس GPS و تعیین محل‌های جمع‌آوری بر روی نقشه

جدول ۲. میانگین مربعات صفات بیوشیمیائی در اکوتیپ‌های مورد بررسی اسپند

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
آنتوسیانین	فلاوونوئید	فنل کل	قند محلول	کلروفیل کل	کلروفیل a		
۱۶۵/۵۲۵**	۱/۰۴۳**	۸/۰۲۵ ^{ns}	۶۵۴۵۳/۰۰۶**	۱۷۷/۱۴۳**	۱۹۵/۱۰۹**	۱/۱۰۹ ^{ns}	۳ اکوتیپ نمونه
۹۷۵۱/۵۲۵**	۲۳/۶۶۹**	۲۴۹/۸۸۵**	۶۲۴۷۳/۳۵۳*	۹۶۳۲/۶۲۲**	۳۷۵۹/۹۲۹**	۱۳۴۱/۲۸۴**	۱ اکوتیپ*نمونه
۱۰/۳۳۰ ^{ns}	۰/۰۷۳ ^{ns}	۱/۳۹۹ ^{ns}	۴۴۲۶۳/۶۳**	۱۳/۳۴۴ ^{ns}	۳۸/۱۱۰*	۴/۲۲۷ ^{ns}	۳ خطای آزمایشی
۱۷/۱۱۷	۰/۰۷۱	۵/۹۱۵	۷۹۶۳/۶۹۳	۱۷/۴۵۵	۱۰/۳۶۴	۲/۵۴۳	۱۸

^{ns} غیر معنی دار، *، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

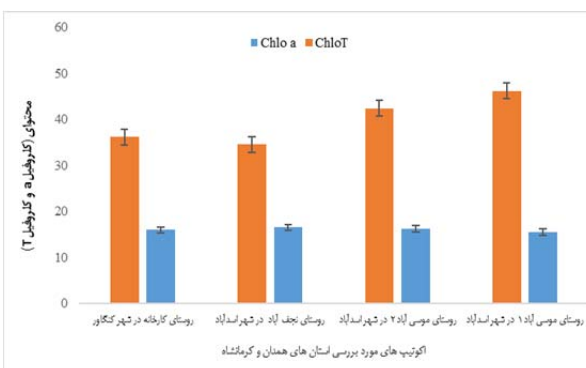
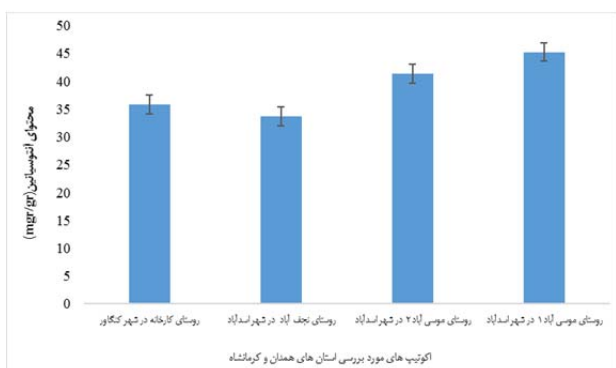
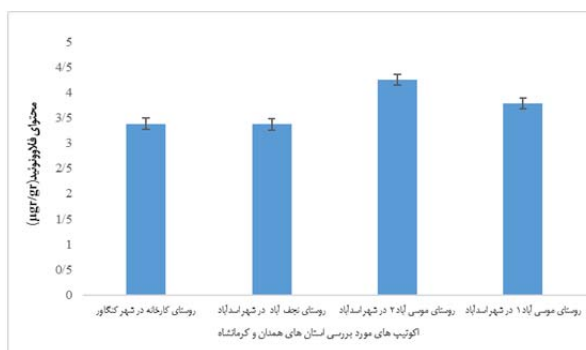
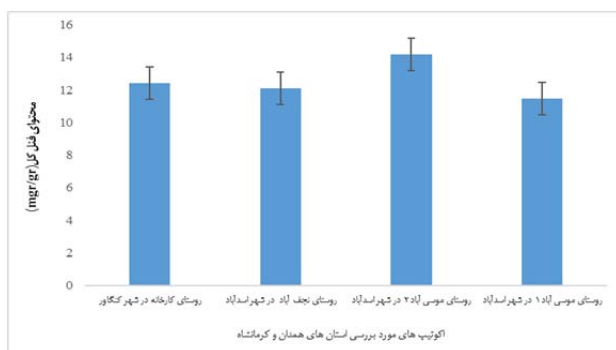
کارخانه و نمونه شماره ۱ روستای موسی‌آباد بیشترین مقدار قند در دانه را به خود اختصاص داده‌اند. در بررسی محتوای کلروفیل b نیز روند تغییر در محتوای این ترکیب در اثر متقابل بین اکوتیپ و نمونه معنی‌دار شده است.

در نتایج حاصل از همبستگی بین صفات مورد بررسی (جدول ۳) نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل وجود دارد. محتوای فنل و فلاونوئید همبستگی منفی و معنی‌دار با کلروفیل کل و همبستگی مثبت و معنی‌دار با آنتوسیانین نشان داده‌اند. محتوای فنل و فلاونوئید نیز دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار است.

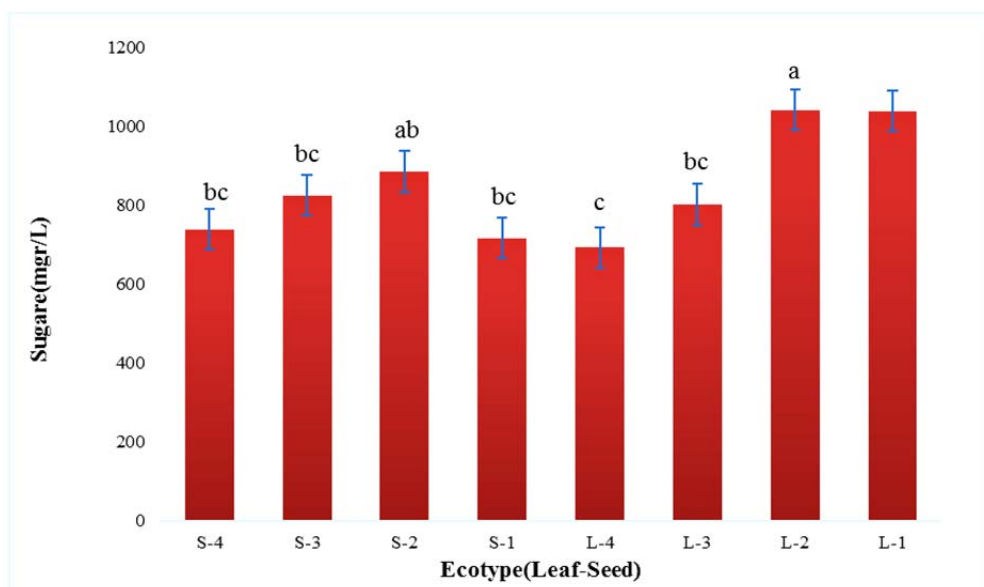
بر اساس رسم نمودار Heat map نیز میزان همبستگی بین صفات مورد بررسی تأیید گردید. میزان همبستگی بر اساس رنگ و میزان شدت و معنی‌داری صفات قابل مشاهده است (شکل ۸). در گروه‌بندی بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی چهار اکوتیپ در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند (شکل ۹). بر اساس این گروه‌بندی نیز نمونه موسی‌آباد ۲ بر اساس اهمیت متابولیت‌های ثانویه دارای بیشترین محتوای فنل و فلاونوئید پس از نمونه موسی‌آباد ۱ بوده است. بر اساس گروه‌بندی با مؤلفه‌های اصلی نیز مؤلفه اول بیشترین سهم را در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها داشته است (جدول ۴).

در بین نمونه‌های موسی‌آباد اکوتیپ شماره ۲ از محتوای فنل بالاتری (۱۴/۱۶۶ میلی‌گرم بر لیتر) و اکوتیپ روستای کارخانه از محتوای فنل پائین‌تری (۱۱/۴۵۳ میلی‌گرم بر لیتر) برخوردار بوده‌اند. در بررسی محتوای فلاونوئید بین اکوتیپ‌ها نیز به ترتیب اکوتیپ‌های شماره ۲ و شماره ۱ روستای موسی‌آباد با مقادیر (۴/۲۵۱ و ۳/۷۹۹) و سپس نمونه‌های روستای کارخانه و روستای نجف‌آباد کمترین مقادیر را به خود اختصاص داده‌اند. در بررسی نتایج مقایسه میانگین محتوای آنتوسیانین و کلروفیل کل بالاترین مقادیر به ترتیب اکوتیپ‌های روستای موسی‌آباد نمونه‌های ۱ و ۲ سپس روستای کارخانه و روستای نجف‌آباد بوده‌اند (شکل ۵).

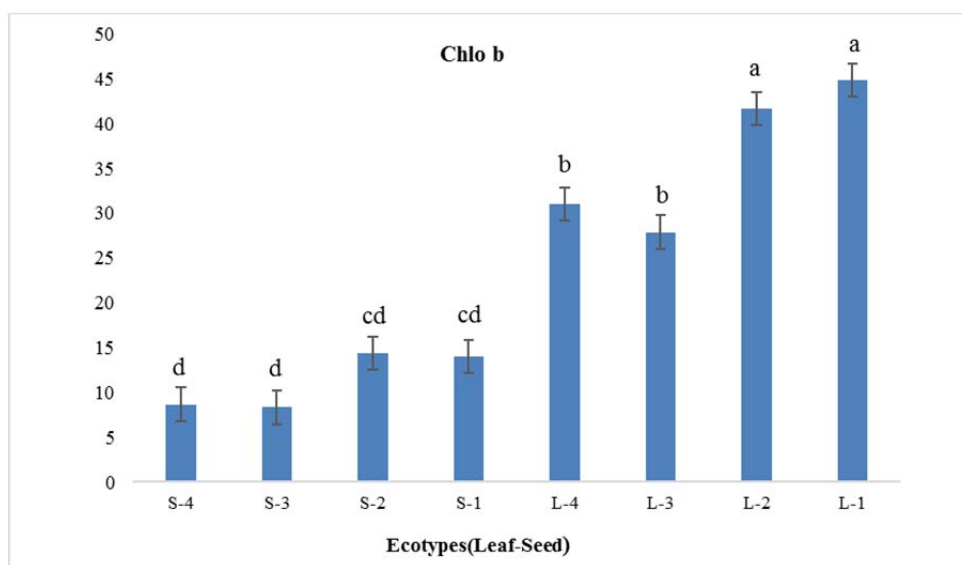
در مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نمونه در محتوای صفات کلروفیل b (mgr/L) (شکل ۶) و قند محلول (mgr/L) (شکل ۷) نیز نتایج نشان داد، میزان دو صفت در برگ بیشتر از دانه بوده است. محتوای قند محلول به ترتیب در برگ نمونه‌های شماره ۲ و ۱ روستای موسی‌آباد (۱۴۰۲/۰۲۳، ۱۰۳۹/۲۰۷) و سپس در نمونه‌های روستای نجف‌آباد و کارخانه بیشترین مقادیر را نشان داده‌اند. در بررسی محتوای قند محلول دانه‌ها نیز به ترتیب اکوتیپ‌های نمونه شماره ۲ روستای موسی‌آباد و سپس نمونه‌های نجف‌آباد، روستای



شکل ۵. مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، کلروفیل a و کلروفیل b در اکوتیپ‌های مورد مطالعه



شکل ۶. میانگین اثر متقابل اکوتیپ در نمونه با بررسی محتوای قند محلول (mgr/L)

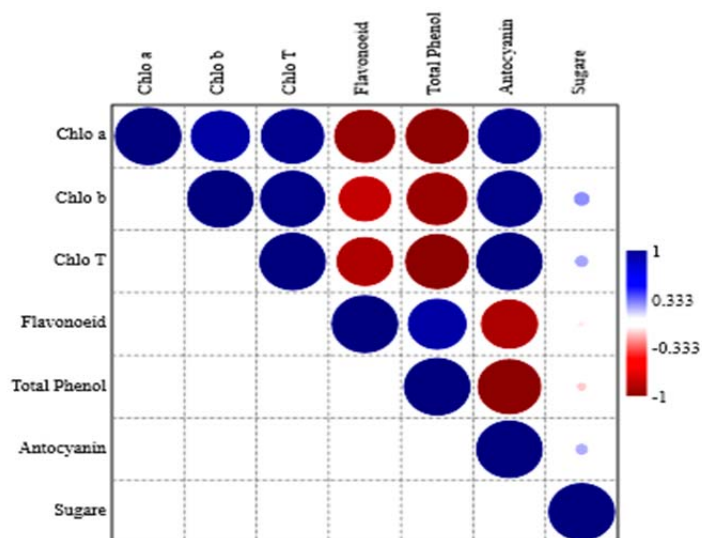


شکل ۷. میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نمونه در بررسی محتوای کلروفیل b

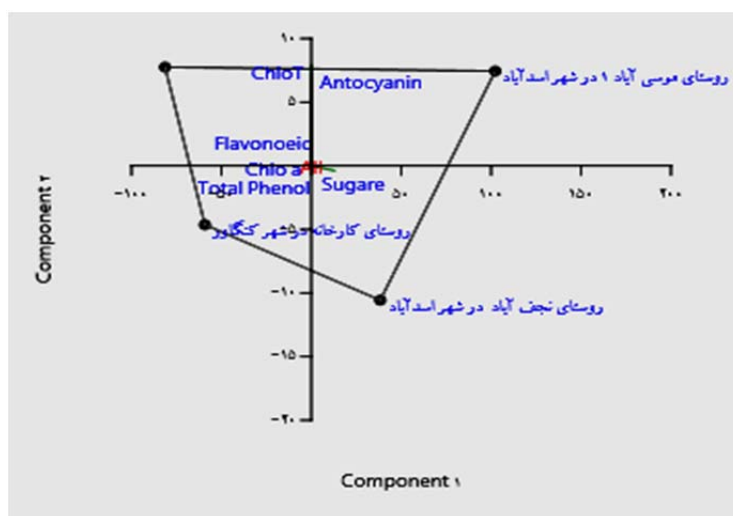
جدول ۳. جدول همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه در چهار اکوتیپ اسپند

	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Flavonoeid (µgr/gr)	Total phenol	Antocyanin	Sugare (mgr/L)
Chlorophyll a	۱	۰/۸۸۶**	۰/۹۵۱**	-۰/۹۱۹**	-۰/۹۵۲**	۰/۹۵۶**	-۰/۳۸
Chlorophyll b		۱	۰/۹۷۸**	-۰/۷۸۰**	-۰/۹۱۲**	۰/۹۷۶**	۰/۲۲۴
Total Chlorophyll			۱	-۰/۸۴۶**	۰/۹۵۷**	۱**	۰/۱۷۸
Flavonoeid (µgr/gr)				۱	۰/۸۷۸**	-۰/۸۲۵**	۰/۰۸۳
total phenol					۱	۰/۹۵۸**	-۰/۱۳۱
Antocyanin						۱	۰/۱۷۴
Sugare(mgr/L)							۱

ns غیر معنی دار، *، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۸. نمودار همبستگی بین صفات مورد بررسی توسط نرم‌افزار PAST



شکل ۹. نمودار بای‌پلات مربوط به صفات مورد بررسی و توده‌های ژنی با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

(شکل ۹). این یافته‌ها نشان دهنده آن است که ساختار جمعیتی اسپند تا حد زیادی با اکوتیپ و موقعیت جغرافیائی ارتباط داد.

بحث

نیاز به یک شناخت پایه از فراوانی، پراکنش گونه‌های گیاهی و ساختار ژنتیکی در مدیریت تنوع زیستی و حفاظت از منابع ژرم پلاسما از اهمیت بالایی برخوردار است. در شرایط مختلف رشدی گیاهان تولید متابولیت‌های ثانویه متفاوت است. بنابراین غلظت و نوع متابولیت‌های ثانویه تولید شده در گیاه با دخالت عوامل بسیاری از جمله تنوع گونه گیاهی، مرحله‌ی رشدی، فیزیولوژی، عوامل محیطی، ارتفاع از سطح دریا و خاک دچار تغییر می‌شوند

جدول ۴. سهم واریانس مؤلفه‌های اول و دوم در گروه‌بندی و رسم بای‌پلات اکوتیپ‌ها

PC	Eigenvalue	% Variance
۱	۷۳۵۱/۸۸	۹۸/۸۷۲
۲	۸۲/۸۶۹۳	۱/۱۴۵
۳	۱/۰۰۰۶	۰/۰۱۳

نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در بررسی و گروه‌بندی صفات و اکوتیپ‌ها نیز نشان داده است که مؤلفه اول با سهم واریانس (۹۸٪/۸۷۲) بیشترین سهم را در گروه‌بندی اکوتیپ‌ها به خود اختصاص داده است و بر این اساس نمونه‌ها با توجه به صفات مورد بررسی تفکیک و در گروه‌های مجزا جای گرفته‌اند

منطقه خواهد بود. بر این اساس و با توجه به محتوای ترکیبات بیوشیمیایی و محتوای بالای فنل‌ها و فلاونونوئیدها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های مورد بررسی می‌توان بیان داشت که اکوتیپ شماره ۲ روستای موسی‌آباد می‌تواند به عنوان یک نمونه مناسب جهت مطالعات گسترده‌تر در حوزه داروئی به پژوهشگران معرفی گردد. همچنین می‌توان از این اکوتیپ از نظر متابولیت‌های ثانویه به عنوان والدین در برنامه‌های اصلاحی بهره برد. همچنین شناسایی محتوای عصاره اسپند بر اساس روشگاه آن در مراحل مختلف رشدی گیاه ضروری است و امکان فراهم کردن استخراج مواد مؤثره در استفاده‌های کاربردی از فرآورده‌های آن و توان افزایش عملکرد دارویی گیاهان را سبب می‌شود.

(ایسا، ۲۰۱۹). میزان کیفی و کمی متابولیت‌های ثانویه مؤثر در گیاهان داروئی هر منطقه، تحت تأثیر شرایط اقلیمی، عوامل محیطی و تنش‌های اکولوژیک آن منطقه می‌باشد. تغییرات حاصل از محتوای ترکیبات بیوشیمیایی نمونه‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل دیگری مانند محل رشد گیاه و سن برگ‌ها باشد. در مطالعات مختلف دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌های گیاهی بالا بودن ترکیبات فنلی در آن‌ها می‌باشد. این ترکیبات از طریق عصاره‌های گیاهی آن‌ها قابل استخراج می‌باشد (کاندان و همکاران، ۲۰۰۳). یافته‌ها نشان می‌دهد این گونه‌ها منبع خوبی از محتوای فنل و آنتوسیانین هستند و بهره‌برداری از آن‌ها به عنوان رویکردی برای کاهش ضایعات، از نظر اقتصادی و زیست محیطی به نفع

References

- Arshad, N., Neubauer, C., Hasnain, S., & Hess, M. (2008). *Peganum harmala* can minimize Escherichia coli infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poultry science*, 87(2), 240-249.
- Asghari, G., Ihsanpour, A., Akbari, A., & Akbari, A. (2006). Production of Arbutin by Biotransformation of Hydroquinone Using *Peganum harmala*, *Varthemia persica* and *Pycnocycla spinosa* Cell Suspension Cultures: Production of arbutin from hydroquinone. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 91-96.
- Bermúdez, X., Cancela, M., Merchán, Y., & Sanchez Bermudez, A. (2021). Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Antioxidants from Extractions of Six Eucalyptus Species. *Applied Sciences*, 11(21), 9818.
- Burdock, G.A. (2016). Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients; CRC Press: Boca Raton, FL. USA.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A.H., Akpulat, A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
- Chabir, N., Ibrahim, H., Romdhane, H., Valentin, A., Moukarzel, B., Mars, M., & Bouajila, J. (2014). Seeds of *Peganum harmala* L. chemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities, and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Medicinal chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*, 11(1), 94-101.
- Ebrahimi, M. A., & Zarinpanjeh, N. (2015). Bio-elicitation of β -carboline alkaloids in Cell Suspension Culture of *Peganum harmala* L. *Journal of Medicinal Plants*, 14(55), 43-57.
- El-Bakatoushi R., Hegazy A. K., SaadH, and Fawzy M. (2011). Genetic diversity in coastal and inland desert populations of *Peganum harmala* L. (Peganaceae). *African Journal of Biotechnology*, 10(71), 15883-15890.
- Fadhil, S., Reza, M.E., Rouhollah, G., & Reza, V.R. (2007). Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in *Peganum harmala* L. Using Bromocresol Green. *Research Journal of Phytochemistry*, 1, 79-82.
- Fathiazad, F., Azarmi, Y., & Khodaie, L. (2006). Pharmacological Effects of *Peganum harmala* Seeds Extract on Isolated Rat Uterus: Effects of *Peganum harmala* on rat uterus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 81-86.
- Fille cache, A., Aliabadi, A., Farzane, H., Borzooei, M., & Adarasi, A. (2012). Ecology study of (*Salvia leriifolia*) in Sabzevar. Congress of Horticultural Sciences. Bu-Ali Sina University.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro, F., Fazzino, G., & Ferrara, S. D. (2008). A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic science international*, 179(2-3), e37-e43.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro, F., Fazzino, G., & Ferrara, S. D. (2008). A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic science international*, 179(2-3), e37-e43.

- Ghanbari A, Azimi M, Rafiei A, Biparva P, Ebrahimzadeh M A. 2020. Changes in the phytochemical content of the Cappers Collected from of different microclimates. *Plant Process and Function*, 9 (39), 165-178 (In Persian).
- Gharibi, Shima & Sayed-Tabatabaei, Badraddin & Saeidi, Ghodrattollah. (2015). Comparison of Essential Oil Composition, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Eight Achillea Species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18, 1382-1394. (In Persian)
- Goel, N., Singh, N., & Saini, R.G. (2009). Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nature & Science*, 7(7), 129-34.
- Horwitz, W. (1984). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Washington, D.C. 14th Ed. AOAC.
- Isah., T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Journal of Biological Research*, 52, 1 -25.
- Jia, Z., Tang, M., & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Joyce, C., Pennycooke, S., & Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 225-232.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in Enzymology, eds. L. Packer, and R. Douce. New York: Academic Press. 350-382.
- Mirjana, S., Nada, B., & Valerija, D. (2004). Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *European Food Research and Technology*, 218(4), 367-371.
- Polaki Khoshkrodi R, Bagheri N, Babaeian Jelodar N. 2023. Effect of altitude on some secondary metabolites of the medicinal plant (*Sambucus ebulus* L.) in three different habitats of Mazandaran province. *Plant Process and Function*, 12 (56), 1-16. (in Persian).
- Schlegel, HG. (1956). Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. *Planta*, 47, 510-515.
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Semwal, P., Painuli, S., Özçelik, B., Ediz Hacıhasanoğlu, F., Shabnum Shaheen, Surjit Sen, Krishnendu Acharya, Amirian, M., Marina Salgado Castillo, C., Dolores López, Mauricio Schoebitz, M., Martorell, M., Goloshvili, T., Al-Harrasi, A. et al., (2021). "Peganum spp.: A Comprehensive Review on Bioactivities and Health-Enhancing Effects and Their Potential for the Formulation of Functional Foods and Pharmaceutical Drugs", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5900422,1-22.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Wanntorp, L., & Ronse De Craene, L. P. (2011). Flowers on the Tree of Life. In: Gower, D. J. (ed.) The Systematics Association Special Volume Series. Cambridge University Pres, UK.

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of new male sterile rice lines and validation of associated molecular markers to identify their genetic seed purity

Alireza Tarang*, Majid Sattari

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

Correspondence

Alireza Tarang

Email: a_tarang@hotmail.com

ABSTRACT

The use of heterosis in hybrid rice breeding technology is one of the ways to increase production per unit area, and hybrid rice varieties produce 20 to 30 percent higher yields than improved or high-yielding varieties of the same growing period. The seed of male sterile lines in hybrid rice seed production is controlled based on the potential for producing male sterile lines (A line), evaluation as a fertile line (B line) and the percentage of allogamy or appropriate behaviour of the flowering male sterile lines and the factors that influence this. Ensuring the genetic purity of hybrid seed is a prerequisite for the successful production of hybrid rice. Hybrid seed is often contaminated by pollen from other varieties or by self-fertilisation from impure parental lines (cytoplasmic male sterile). The aim of this study was to identify informative microsatellite markers (SSR) able to discriminate hybrid rice parental lines and allow their use in the evaluation of seed purity, as well as to characterise the morphology of F1 hybrid rice to complement the varietal description. As part of the hybrid rice production programme, an initial evaluation of traits related to the degree of outcrossing, sterility stability and genetic purity in male sterile rice lines is required to select the preferred lines. In the present study, eighteen Iranian and exotic cytoplasmic male sterile lines of different cytoplasmic origins and their maintainers (B line) and one thermosensitive genetic male sterile (TGMS) line, TG51, were tested in a randomised complete block design. The use of molecular markers based on PCR was investigated to assess their purity. The results showed significant differences in plant height, flag leaf length, flag leaf width, number of fertile tiller, flower length and width, panicle length, initial panicle condition, percentage of allogamy, total number and percentage of panicle fertility. The mean comparison of the traits showed that the selection and prioritization of superior lines according to the percentage of fertility, panicle outgrowth, percentage of allogamy and flower density were related to the traits Fajr A and Neda A and IR58025 A. Due to adequate height, panicle length, number of flowers and higher percentage of allogamy in Dasht B, these lines were included in the seed production program as favorable lines. Molecular tests were performed based on PCR using four markers for purity of the seed parent, CMS and differentiation between male-sterile and maintenance lines. The combination of the CMS and RG136 markers as well as the RMT6 marker made it possible to distinguish between CMS-WA lines and those without male sterility. The results showed that the bands of the *drccms* marker discriminate cytoplasmic male sterility lines between different WA, DISSI and Gambiaca sources and generate different monomorphic fragments for each of the male sterile and B lines. Therefore, these markers can be used for genetic purity and possible infection test of seed parents and suitable alternative for GOT.

KEYWORDS

CMS-WA, Cytoplasmic male sterility, Hybrid rice, Molecular marker.

How to cite

Tarang, A., & Sattari, M. (2024). Characterization of new male sterile rice lines and validation of associated molecular markers to identify their genetic seed purity. *Crop Biotechnology*, 13(46), 45-57.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

تعیین خصوصیات لاین‌های جدید نرعقیم برنج و اعتبارسنجی نشانگرهای مولکولی همبسته برای تشخیص خلوص ژنتیکی بذران‌ها

علیرضا ترنگ*، مجید ستاری

چکیده

استفاده از پدیده هتروزیس در فناوری برنج هیبرید یکی از راه‌های دستیابی به افزایش عملکرد در واحد سطح است و ارقام برنج هیبرید موجب افزایش ۳۰-۲۰ درصدی عملکرد نسبت به ارقام اصلاح شده پر محصول می‌گردد. در این مطالعه، خلوص ۱۸ لاین نرعقیم سیتوپلاسمی ایرانی و خارجی و نگهدارنده آن‌ها به همراه یک لاین نرعقیم ژنتیکی به نام TG51 با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR ارزیابی شد. این لاین‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کشت و سپس خلوص آن‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی، ارزیابی شد. مقایسه میانگین صفات نشان داد که لاین‌های برتر از نظر صفات مورد مطالعه به ترتیب لاین‌های نرعقیم IR58025A، فجر A و ندا A بودند. جهت بررسی خلوص بذور والد CMS و تمایز بین لاین نرعقیم و نگهدارنده آزمایشات مولکولی با استفاده از ۴ نشانگر مبتنی بر PCR انجام شد. در نشانگر ترکیبی CMS و RG136 و همچنین نشانگر RMT6 بیشترین تمایز بین لاین‌های CMS-WA و نگهدارنده حاصل شد و در منابع دیگر نرعقیمی کارایی نداشتند. اما نتایج حاصل از باندهای تولیدی نشانگر drrcms نشان داد که این نشانگر می‌تواند به خوبی بین تمامی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی از منابع مختلف Gambiaica, Arc, WA و نگهدارنده تمایز ایجاد کند؛ لذا از این نشانگر می‌توان در تست خلوص ژنتیکی و تشخیص آلودگی‌های احتمالی در بذور والدینی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

برنج هیبرید، نرعقیمی سیتوپلاسمی، CMS-WA، نشانگر مولکولی.

موسسه تحقیقات برنج ایران (RRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:

علیرضا ترنگ

رایانامه: a_tarang@hotmail.com

استناد به این مقاله:

ترنگ، علیرضا و ستاری، مجید (۱۴۰۳). تعیین خصوصیات لاین‌های جدید نرعقیم برنج و اعتبارسنجی نشانگرهای مولکولی همبسته برای تشخیص خلوص ژنتیکی بذران‌ها. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۴۵-۵۷.

مقدمه

قابلیت ترکیب‌پذیری مناسب، پتانسیل بالای دگرگشنی، رفتار مناسب گلدهی، تولید بذور خالص و مقاومت به آفات و امراض علاوه بر افزایش تولید بذور باعث اقتصادی شدن تولید بذر هیبرید برنج می‌گردد. موفقیت در کشت برنج هیبرید به کارایی تکنولوژی تولید بذر در تأمین به موقع بذور با خلوص ژنتیکی بالا وابسته است. برآورد شده است که به ازای هر یک درصد ناخالصی در بذر هیبرید، ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کاهش عملکرد خواهیم داشت (مائو و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از لاین‌های والدینی خالص در تولید بذر هیبرید می‌تواند سطوح خلوص موردنیاز برای بذر هیبرید را تضمین نماید. معمول‌ترین آلودگی‌هایی که در تولید بذر هیبرید مشاهده می‌گردد مربوط به اختلاط لاین‌های نگهدارنده با CMS لاین می‌باشد (شیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). این اختلاط سبب کاهش شدید عملکرد در نسل بعد خواهد شد. امکان تمایز لاین‌های CMS و نگهدارنده قبل از گلدهی وجود ندارد و حذف ناخالصی‌ها نیازمند به کار بیشتر می‌باشد که در نتیجه هزینه تولید بذر هیبرید افزایش یافته و همچنین کیفیت آن نیز کاهش معنی‌داری خواهد یافت. همچنین در روند برنامه تولید برنج هیبرید ارزیابی اولیه از صفات مرتبط با میزان دگرگشنی در لاین‌های نرعیق، پایداری عقیمی و همچنین میزان خلوص ژنتیکی جهت گزینش لاین‌های مطلوب ضروری است. این مطالعه با هدف ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی، رفتار گلدهی و میزان دگرگشنی لاین‌های جدید نرعیق سیتوپلاسمی، ارزیابی و اعتبارسنجی تعدادی نشانگر مولکولی همسته جهت تمایز دقیق بین لاین‌های نرعیق و لاین‌های نگهدارنده آن اجرا گردید.

پیشینه پژوهش

در سه دهه اخیر کشورهای مختلف جهان به ویژه کشورهای آسیایی بسته به شرایط و نیازهای خود اقدام به معرفی ارقام برنج هیبرید نمودند. ارقام هیبرید NSIC Rc114H، PSB Rc26H، PSB Rc72H و NSIC Rc116H از جمله مهم‌ترین ارقام معرفی شده در کشور فیلیپین می‌باشند. رقم PSB Rc72 در مؤسسه تحقیقات برنج فیلیپین در آزمایش‌های مزرعه‌ای مقایسه عملکرد، ۱۲ تن در هکتار محصول تولید نمود که نسبت به متوسط عملکرد در این کشور (۳۲۵۰ کیلوگرم در هکتار) بسیار بیشتر بود. متوسط عملکرد این رقم در مزرعه کشاورزان، ۱۰/۶ تن در هکتار بود محققان این کشور معتقدند که با اختصاص ۱/۴

برنج بعد از گندم یکی از مهم‌ترین منابع غذایی و تأمین کالری بیش از نیمی از جمعیت جهان است. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت، کاهش زمین‌های زیر کشت، ضرورت افزایش تولید و پایداری این محصول استراتژیک، استفاده از روش‌های نوین جهت تولید بیشتر اجتناب‌ناپذیر است. یکی از این روش‌ها استفاده از فناوری برنج هیبرید است. افزایش عملکرد ارقام هیبرید تا میزان ۲۰ درصد نسبت به ارقام اصلاح شده به روش معمول، سبب توسعه روزافزون آن گردیده است (حسین ۱۹۹۶، پارادو ۱۹۹۸، ویرمانی و همکاران، ۲۰۰۴). جونز در سال ۱۹۲۶ برای اولین بار پدیده هتروزیس را در برنج گزارش کرد و چین اولین کشوری بود که از این پدیده در تولید برنج هیبرید به صورت تجاری استفاده نمود (معین و همکاران، ۱۹۸۷). از لحاظ تئوری انتظار می‌رود تلاقی بین لاین‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند منجر به هتروزیس بالاتری در نتاج شود. (نیوبری، ۲۰۰۳). اساساً دو روش مختلف برای ایجاد هیبریدهای برنج به کار می‌رود که اولین روش یک سیستم شامل سه لاین (لاین‌های نرعیق سیتوپلاسمی (CMS) یا A line، لاین نگهدارنده یا B line و لاین برگرداننده باروری یا R line) و دومین روش یک سیستم اصلاح دولاینی نرعیقی لاین‌های حساس به دما است که در آن تنها دو لاین در تولید برنج هیبرید دخالت دارند. امکان تولید اقتصادی در سیستم اصلاح دولاینی وجود دارد و می‌تواند جایگزین مناسبی به جای سیستم سه لاینی گردد (تیاگاراگان و همکاران، ۲۰۱۰). با این وجود سیستم سه لاینی (CGMS) پایدارترین و معمول‌ترین سیستم به کار رفته برای توسعه برنج هیبرید در بسیاری از کشورها از جمله چین، ویتنام، هند و بنگلادش می‌باشد. هرچند سیستم‌های نرعیقی (CMS) مختلفی از قبیل، WA، Arc، GAM و DISSI توسعه یافته وجود دارند اما با این وجود لاین‌های دارای سیتوپلاسم Wild Abortive A عمومی‌ترین لاین‌های مورد استفاده از میان لاین‌های CMS به کار رفته برای توسعه هیبرید سه لاینی در کشورهای که برنج هیبرید را به صورت تجاری کشت می‌کنند می‌باشند (یوان، ۱۹۹۵). پتانسیل تولید بذر لاین نرعیق (A line) و همچنین میزان درصد دگرگشنی و یا رفتار مناسب گلدهی لاین نرعیق و عوامل مؤثر بر آن نقش بسیار مهمی در تولید بذر برنج هیبرید دارد؛ بنابراین تهیه و تولید لاین‌های جدید نرعیق با

می‌کشد (ستاری، ۱۳۹۷). از این رو ضرورت اصلاح لاین‌های جدید هیبرید و بهبود نقاط ضعف آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و مورد توجه به‌نژادگران می‌باشد. روش معمول برای تست خلوص بذر، روش (GOT) (Grow-Out-Test) می‌باشد. تست GOT شامل ارزیابی ویژگی‌های متعدد مورفولوژیکی و گلدهی در گیاهان بالغ برای تمایز هیبریدها است (ورما، ۱۹۹۶، یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲). با این وجود روش GOT به دلیل متاثر بودن از شرایط محیطی و نیاز به گذار از مرحله نموی خاص ناکارآمد است از اینرو استفاده از نشانگرهای DNA برای تست خلوص بذر پیشنهاد شده است، زیرا از این روش می‌توان برای ارزیابی دقیق و سریع ژنوتیپ یک گیاه استفاده کرد. یاشیتولا و همکاران با یک نشانگر SSR مبتنی بر PCR، مطالعاتی روی تمایز لاین‌های برنج با سیتوپلاسم WA از لاین‌های نگهدارنده هم‌جنس‌شان انجام دادند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). سوندارام و همکاران، زینیان و همکاران از نشانگرهای SSR جهت تمایز لاین‌های والدینی هیبرید و نیز ارزیابی خلوص بذور هیبرید استفاده کردند (سوندارام و همکاران، ۲۰۰۸، زینیان و همکاران، ۲۰۰۵). نیرمالا و همکاران جهت تمایز بین CMS لاین‌ها و نگهدارنده‌های مربوط به آن‌ها از نشانگرهای AFLP استفاده کردند (نیرمالا و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه‌ای دیگر نشانگرهای ریز ماهواره و STS برای تمایز بین CMS لاین و نگهدارنده‌ها، برگرداننده باروری و هیبرید، غربال شده‌اند و سودمند بودن آن‌ها را برای برآورد خلوص بذور هیبرید گزارش کرده‌اند (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۲) همچنین از نشانگرهای STMS برای انگشت‌نگاری برنج‌های هیبرید و لاین‌های والدینی‌شان استفاده گردید و پس از تأیید نتایج با تست GOT از آن‌ها برای تست خلوص ژنتیکی بذور هیبرید استفاده شد (ناندا کومار و همکاران، ۲۰۰۴). راجندراکومار و همکاران یک توالی DNA میتوکندریایی را برای تمایز بین لاین‌های CMS و نگهدارنده هم‌جنس‌شان شناسایی کردند و بیان کردند که به کارگیری این مارکر به‌عنوان جایگزینی برای اصول مورفولوژی GOT در آشکارسازی دقیق آلودگی در پایه بذور CMS امکانپذیر می‌باشد (راجندراکومار و همکاران، ۲۰۰۷).

روش شناسی پژوهش

این آزمایش با هدف ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی رفتار گلدهی و میزان دگرگشتی لاین‌های جدید نرعیقم سیتوپلاسمی، ارزیابی و اعتبارسنجی چهار نشانگر مولکولی همبسته جهت تمایز

میلیون هکتار از شالیزارهای این کشور به کشت ارقام برنج هیبرید نه‌تنها می‌توانند در تولید برنج خودکفا شوند؛ بلکه قادر به صادرات این محصول نیز می‌باشند (دلاکروز، ۲۰۰۳). در آزمایشی در ابری^۱ رقم خالص IR72 و هیبرید IR75217H در ۴ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت که نتیجه آن افزایش معنی‌دار عملکرد رقم هیبرید بود. در این آزمایش که نقش تعداد پنجه در افزایش عملکرد با تیمارهای سنین مختلف گیاهچه (۷، ۱۴، ۲۱ روزه) و تعداد بوته در مترمربع در دو سطح ۲۵ و ۵۰ عدد مورد ارزیابی قرار گرفته بود، رقم هیبرید به دلیل کنترل مناسب پنجه‌زنی و عدم تولید پنجه‌های غیرمؤثر توانست مواد پرورده اندوخته شده را به سمت پنجه‌های مؤثر هدایت نموده و موجب افزایش عملکرد گردد (لافارج و همکاران، ۲۰۰۴).

اولین فعالیت تحقیقاتی در خصوص برنج هیبرید در ایران از سال زراعی ۱۳۶۶ در دانشکده کشاورزی ساری و مؤسسه تحقیقات برنج آمل در مازندران با واردکردن دو لاین نرعیقم سیتوپلاسمی به نام‌های V20A و W32A شروع شد (نعمت‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵) همچنین جهت ارزیابی تعدادی از لاین‌های برنج هیبرید آزمایش مقدماتی مقایسه عملکرد با تعداد شش ژنوتیپ هیبرید، هفت لاین والدینی و رقم خزر به عنوان شاهد اجرا شد و نتایج نشان داد که لاین هیبرید (IR58025A/IR42686R) با عملکرد ۷۳۴۵ کیلوگرم در هکتار و هتروزیس استاندارد ۵۶ درصد نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری قابل توجهی داشت (درستی، ۱۳۸۱). در مطالعه ترکیب‌پذیری تعدادی از ارقام برنج در موسسه تحقیقات برنج کشور چهار لاین هیبرید که از نظر زودرسی و پتانسیل عملکرد دانه برتری چشمگیری نسبت به سایر ارقام داشتند، شناسایی شدند. همچنین در آزمایش دیگری هیبرید امیدبخش IR58025A/IR42686R با عملکرد ۷-۸ تن در هکتار و سازگاری مناسب در مناطق مختلف مورد توجه قرار گرفت و هتروزیس این هیبرید از ۲۴/۵ تا ۴۶ درصد برآورد گردید. با توجه به مطلوب بودن عوامل کیفی، هیبرید مذکور در سال ۱۳۸۹ به عنوان رقم هیبرید دیلم به جامعه کشاورزان معرفی شد (درستی، ۱۳۸۹).

ضعف شکم سفیدی، پوکی، درصد خرد بالای دانه و نیز دیررس بودن ارقام برنج هیبرید، بزرگ‌ترین عیب آن‌ها محسوب می‌شود که توسعه و ترویج این نوع ارقام را به چالش

شدند. روش کشت به صورت نشایی بوده و برای این کار در نیمه اول فروردین بذور A line و B line به میزان حدود ۱۰۰ گرم در متر مربع به طور جداگانه در خزانه به صورت ایستگاهی با پوشش پلاستیکی بذر پاشی شدند. برای خزانه A line جهت جلوگیری از تداخل بذر، بذر پاشی در کرت‌هایی با فاصله پنج متر از هم رعایت شد. همزمان با رشد گیاهچه در خزانه اقدام به آماده سازی زمین اصلی نموده و کاملاً تسطیح و آب تخت شد. وقتی که گیاهچه‌ها به حدود چهار برگ رسیده و قبل از پنجه زنی در خزانه، گیاهچه‌های والد نر عقیم (A line) و لاین نگهدارنده (B line) با سن حدود ۲۵ روزه نشاکاری شدند. همچنین به منظور اعتبار سنجی، نشانگرهای مولکولی همسته جهت ارزیابی خلوص ژنتیکی بذور لاین‌های CMS و تمایز بین لاین نر عقیم و نگهدارنده آن‌ها استفاده گردید. در این تحقیق از ۴ نشانگر مبتنی بر PCR شامل نشانگرهای ترکیبی CMS (سیتوپلاسمی)، RG136 (هسته‌ای)، RMT6 (هسته‌ای) و drrcms (سیتوپلاسمی) جهت تست خلوص ژنتیکی و تشخیص آلودگی‌های احتمالی در بذور والدینی و تمایز بین لاین‌های نر عقیم و لاین‌های نگهدارنده آنها استفاده شد (جدول ۲).

دقیق بین لاین‌های نر عقیم و لاین‌های نگهدارنده آن اجرا گردید. در تحقیق حاضر دو لاین جدید نر عقیم سیتوپلاسمی به نام‌های فجر A و شیروودی A حاصل از تلاقی برگشتی بین ارقام فجر و شیروودی با لاین نر عقیم IR58025A و اولین لاین نر عقیم ژنتیکی حساس به درجه حرارت (TGMS) ایرانی بنام TG51 حاصل از القای موتاسیون با گاما 250GY در رقم نعمت (سیه‌چهره و همکاران، ۱۴۰۲) به همراه تعداد ۱۶ لاین نر عقیم سیتوپلاسمی خارجی و ایرانی از منابع سیتوپلاسمی مختلف و لاین‌های نگهدارنده آن‌ها جمعاً به تعداد ۱۹ لاین از نظر خصوصیات زراعی و رفتار گلدهی شامل صفات ارتفاع بوته (سانتی‌متر) طول برگ پرچم (سانتی‌متر)، عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)، تعداد پنجه بارور، طول گلچه (سانتی‌متر)، عرض گلچه (سانتی‌متر)، طول خوشه (سانتی‌متر)، وضعیت خروج خوشه و درصد دگرگشتی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در سه تکرار ارزیابی شدند. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لیست لاین‌های نر عقیم مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. کلیه لاین‌های نر عقیم و نگهدارنده به صورت مجزا و ایزوله در کنار هم مورد کشت قرار گرفتند و توسط چتایی از هم جدا

جدول ۱. لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده مورد مطالعه

Table 1. Cytoplasmic male sterile and maintainer rice lines studied

لاین نر عقیم A line	منبع عقیمی source	لاین نگهدارنده B line	وضعیت Condition
فجر A	CMS-WA (IR58025A × فجر)	فجر B	Maintainer
شیروودی A	CMS-WA (IR58025A × شیروودی)	شیروودی B	Maintainer
نعمت A	CMS-WA (IR58025A × نعمت)	نعمت B	Maintainer
ندا A	CMS-WA (IR58025A × ندا)	ندا B	Maintainer
هراز A	CMS-WA (IR58025A × هراز)	هراز B	Maintainer
دشت A	CMS-WA (IR58025A × دشت)	دشت B	Maintainer
چمپا A	CMS-WA (IR58025A × چمپا)	چمپا B	Maintainer
IR 58025 A	CMS-WA	IR 58025 B	Maintainer
IR 68897 A	CMS-WA	IR 68897 B	Maintainer
IR73328 A	MUTANT IR62829 B	IR73328 B	Maintainer
IR 68885 A	MUTANT IR62829 B	IR 68885 B	Maintainer
IR 68902 A	CMS-WA	IR 68902 B	Maintainer
IR 68899 A	CMS-WA	IR 68899 B	Maintainer
IR 75596 A	CMS-WA	IR 75596 B	Maintainer
IR 79124 A	MUTANT IR62829 B	IR 79124 B	Maintainer
IR 78376 A	Gambiaca	IR 78376 B	Maintainer
IR 75601 A	CMS-DISSI	IR 75601 B	Maintainer
IR78328 A	CMS-WA	IR78328 B	Maintainer
TG 51	Nemat TGMS		

جدول ۲. اطلاعات نشانگرهای مورد مطالعه

Table 2. Information of the studied markers

نشانگر Primer	آغاز گر رفت Forward	آغاز گر برگشت Reverse	منبع Refrance
CMS	ACTTTTGTGTT TTTGTGTAGG	TCCCAGAAAGCTACTACAGC	(باشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴)
RG136	TCCCAGAAAGCTACTACAGC	GCAGACTCCAGTTGACTTC	(فا و لانگ، ۲۰۰۴)
RMT6	GATGGTTTGGGAAGGCTG	GGGTTTATAGATCGCCAC	(احمدی‌خان و همکاران، ۲۰۱۵)
Drrcmc	ACCTTTGGGCGATGGTT	GGGTTTATAGATCGCCAC	(احمدی‌خان و همکاران، ۲۰۱۵)

تعداد پنجه بارور، سطح برگ پرچم، طول خوشه و درصد خروج خوشه از غلاف، اثرات معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴)، لاین‌های نرعیتم IR68885A، IR58025A و ندا A دارای کوتاهترین ارتفاع بودند. همچنین، تعداد پنجه‌های بارور در لاین‌هایی که دارای ارتفاع کمتری بودند، مانند IR58025A و ندا A، بیشتر بود. این امر ظرفیت تولید بذر بیشتر را ممکن می‌سازد. سطح برگ پرچم از صفات مهم در فتوسنتز و پر شدن دانه‌ها پس از لقاح است. با وجود اینکه در تولید بذر هیبرید قسمتی از برگ پرچم حذف می‌شود (به دلیل انتقال بهتر دانه گرده بر روی کلاله مادگی)، اما نقش آن انکارناپذیر است. با توجه به جدول ۴ لاین‌های IR58025A و IR68902A بیشترین و لاین IR68899A کمترین سطح برگ را داشتند. در این تحقیق صفات خروج خوشه از غلاف و ریشک نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد خروج کامل خوشه از غلاف از صفات مطلوب لاین‌ها است. لاینی که خروج خوشه بیشتری داشته باشد، تعداد گلچه بیشتری در معرض محیط قرار می‌دهد و بنابراین تعداد دانه نوکلئوس بیشتری قابلیت تولید پیدا می‌کند. در این میان، لاین‌های چمپا A، هراز A و IR75601A دارای بیشترین طول خوشه و لاین IR68899A دارای کوتاهترین طول خوشه بود. صفت تعداد کل گلچه و همچنین تعداد دانه بارور و عقیتم نقش تعیین‌کننده و مستقیمی در عملکرد دارند. با توجه به عقیتم بودن لاین‌های A، میزان دانه‌های بارور تشکیل شده در آن بسیار پایین است. بنابراین، باید لاین‌هایی که دارای درصد دگرگشتی بالاتری هستند جهت والدین تولید بذر انتخاب نمود. لاین‌های IR68885A و فجر A دارای بیشترین میزان دگرگشتی بودند. با توجه به جدول ضرایب همبستگی (جدول ۵)، صفت ارتفاع بوته با صفات طول خوشه و سطح برگ پرچم همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد. از طرفی، طول

از هر یک از لاین‌ها نمونه برگ‌های جوان بوته به مقدار لازم برای استخراج DNA برداشت و پس از قرار گرفتن درون فویل‌های ۱۵×۱۵ سریعاً به فلاسک یخ منتقل گردید و در پایان کار به فریزر -۷۰ درجه سلیسیوس انتقال داده شد تا در فرصت مناسب DNA استخراج گردد. استخراج DNA به روش CTAB و با تغییراتی انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۰/۴ میلی مول دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPS)، یک واحد DNA پلیمرز و ۰/۲۵ پیکومول از هر آغازگر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۴ چرخه و اسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵/۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد. الگوی نواربندی ایجاد شده توسط نشانگرها برای تشخیص لاین‌های نرعیتم (A line) از نگهدارنده (B line) در برنج به کار گرفته شد. محصولات تکثیر شده در روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ران و رنگ آمیزی بوسیله محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میکرولیتر) انجام شد. عکسبرداری با استفاده از دستگاه eGel documenter در زیر نور UV صورت پذیرفت.

یافته‌های پژوهش

مطالعه و بررسی برخی خصوصیات مورفولوژیکی

لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی (A line) لاین

در این پژوهش، تعدادی از خصوصیات مورفولوژیکی لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی (A Line) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که برای صفات ارتفاع بوته،

مربوط به IR58025A، فجر A و ندا است. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به محدودیت‌های موجود در تکثیر لاین‌های نرعیقیم، از جمله دستیابی به میزان قابل قبولی از تلاقی مؤثر و تشکیل بذر در فرایند گرده‌افشانی، لازم است جهت رفع این نقیصه، لاین‌های نرعیقیم و نگهدارنده دارای خصوصیات مطلوب مورفولوژیکی و آلوگامی باشند یا در این راستا اصلاح شوند.

خوشه با سطح برگ پرچم نیز همبستگی معنی‌دار دارد. همچنین، طول برگ پرچم با میزان عقیمی دانه همبستگی منفی دارد. تعداد گلچه‌های تشکیل شده بر روی خوشه‌ها نیز با طول و عرض دانه‌ها همبستگی منفی معنی‌داری دارد. گزینش و اولویت‌بندی لاین‌های برتر مورد مطالعه از نظر صفات مورد مطالعه نظیر درصد باروری، خروج خوشه از غلاف، درصد دگرگشتی و تعداد گلچه به ترتیب

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی لاین‌های نرعیقیم برنج مورد مطالعه

Table 3. Analysis of variance for morphological traits in male sterile rice lines studied

میانگین مربعات (MS)											درجه آزادی (df)	منابع تغییرات Sources of variation
درصد دگرگشتی Cross fertilization (%)	عرض دانه Grain width	طول دانه Grain length	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد گلچه number of flowers	طول خوشه Panicle length	عرض برگ پرچم Flag leaf width	طول برگ پرچم Flag leaf length	تعداد پنجه Tiller number	ارتفاع بوته Plant height		
۴۸/۰۰**	۰/۰۹۸**	۴۲۷۷/۶۰۰**	۱۸۶/۶۶**	۳۳۷۳/۷۱**	۱/۶۶**	۱۸/۶۶**	۰/۰۷۰**	۱۰۸/۶۱**	۶۶/۰۳**	۴۸۳/۱۷**	۱۸	لاین
۶/۰۲	۰/۰۶۱	۰/۰۰۱	۹۹۱/۰۰	۱۸۸۰	۱۰۷۲/۶۰	۰/۶۱	۰/۰۰۵	۴۹/۹۴	۱۱/۵۲	۱۳۶/۱۳*	۲	تکرار
۹/۳۲	۰/۰۳۴	۰/۰۰۲	۹۱۸/۸۵	۲۸/۴۵	۶۸۵/۴۳	۲/۴۸	۰/۰۰۸	۲۴/۸۰	۴۲/۲۷	۳۰/۹۲	۳۶	اشتباه آزمایشی
۸/۶	۱۲/۳	۹/۷	۱۵/۴	۱۸/۲	۱۹/۳	۴/۸	۸/۴	۲/۶	۹/۴	۷/۶		خطای تجربی Experimental error
												ضریب تغییرات (CV)

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و یک درصد، ns: غیر معنی‌دار

ns: Not significant, * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۴. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی لاین‌های نرعیقیم سیتوپلاسمی برنج

Table 4. Mean comparison of morphological traits in male sterile rice lines studied

درصد دگرگشتی cross fertilization (%)	عرض دانه (میلی‌متر) Grain width (mm)	طول دانه (میلی‌متر) Grain length (mm)	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد گلچه number of flowers	طول خوشه (سانتی‌متر) Panicle length (cm)	عرض برگ پرچم (سانتی‌متر) Flag leaf width (cm)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر) Flag leaf length (cm)	تعداد پنجه Tiller number	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)	لاین‌های A A lines
1.9 de	1.02 c-e	2.5 bc	215.67 a-f	4 c-e	219.33 b-g	25.07 f-i	1.57 ab	43 a-c	35.7 a	81.33 e	IR 58025 A
0.5 e	1.1 abc	2.4 c	249.33 abc	1.33 de	276.33 a	25.47 e-i	1.5abc	c-42.17 a	29.33 b-d	91.33 c-e	IR شیرودی A
11.4 ab	1.12 ab	2.5 bc	124.33 g	17 b	i۶۷152/	29.53 bc	1.37 cd	41.7 a-c	25.33 a-d	b 102	فجر A
0.53 e	1.13 a	2.67 abc	192.67 c-f	1 de	193.33 ei	32.6 a	1.27 d-e	48 a	23.33 a-d	101.33 b	نعمت A
6.63 b-d	1.1 abc	2.67 abc	126.67 g	10 b-e	162.33 h-i	27.77 b	1.4 b-d	31.7 ef	30.33 a-c	86.33 d-g	ندا A
5.2 c-e	1.1 abc	2.5 bc	239.67 a-d	12.33 bc	252 a-d	30.4 ab	1.4 b-d	47 ab	20.7 b-d	119 a	هراز A
4.03 c-e	1.08 a-d	2.5 bc	217.33 a-f	9.33 b-e	227.33 a-g	28.17 b-e	1.4 b-d	c-41.33 a	24.7 a-d	119 a	دشت A
1.13 d-e	1.02 c-e	2.5 bc	255 ab	3 c-e	257.6 abc	28.97 b	1.57 ab	38 b-e	22.7 b-d	114 a	چمپا A
3.17 c-e	1.03 c-e	2.5 bc	212.33 a-f	6.67 c-e	219.33 b-g	22.7 i	1.47 abc	32 d-f	19 b-d	78.7 g	IR 78378 A
1.77 de	1 de	2.67 abc	230.67 a-e	4 c-e	234.67 a-f	29.33 bc	1.23 d-e	34.17 c-	21.7 b-d	91 c-e	IR 68897 A
14.53 a	1.01 de	2.5 bc	175 e-g	30.67 a	211.33 c-h	26.23 d-h	1.2 e	47.17 ab	31.33 ab	88 d-g	IR 68885 A
0.13 e	1.05 a-e	2.83 ab	202.67 b-f	0.33 e	180.67 g-i	24.8 g-i	1.23 d-e	38.7 a-e	25 a-d	94.7 b-d	IR 79124 A
1.13 de	1.01 de	2.5 bc	224.33 a-f	2.33 c-e	226.33 a-g	27.8 b-g	1.43 abc	31 ef	18 cd	92.33 b-d	IR 68902 A
0.33 e	1.08 a-d	2.5 bc	262.33 a	1 de	264 ab	28.54 b	1.6 a	-33.33 c	2.33 b-d	96.33 b-d	IR 78376 A
4.03 c-e	1 de	2.5 bc	208.33 a-f	9.67 b-e	241.67 a-e	29.9 abc	1.47 abc	39 a-e	21.7 b-d	88.33 d-g	IR 75601 A

5.77 c-e	1.03 b-e	2.5 bc	169.67 fg	11.33 bc	201.33 d-i	24.4 hi	1.1 e	5.26 f	25.7 a-d	-33.79 f	IR 68899 A
2.30 de	0.97 e	2.5 bc	186.33 def	3.67 c-e	118.33 fi	25.03 f-i	1.43 abc	43a-c	20.33 b-d	113 a	IR 73328 A
8.37 bc	0.98 e	2.83 ab	211 a-f	18.33 b	229.67 a-g	27.06 cg	1.5 abc	-41.33 a	16.7 d	95.7 b-d	IR78328 A
0.17 e	1.13 a	3 a	200.67 b-f	0.33 e	201 d-i	28.03 bf	1.23 de	38 b-e	23.33 a-d	89.33 d-f	TG 51

در هر ستون حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد به کمک آزمون دانکن است.
Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan test.

جدول ۵. ضرایب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی مختلف در لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی برنج

Table 5. Correlation coefficients between different morphological traits in male sterile rice lines studied

صفات Traits	ارتفاع بوته Plant height	تعداد پنجه Tiller number	طول برگ پرچم Flag leaf length	عرض برگ پرچم Flag leaf width	طول خوشه Panicle length	تعداد گلچه number of flowers	تعداد دانه های بارور Filled grain number	تعداد دانه عقیم Sterile grain number	طول دانه Grain length	عرض دانه Grain width	درصد دگرگشتی cross fertilization (%)
ارتفاع بوته Plant height	1.00										
تعداد پنجه Tiller number	-0.15	1.00									
طول برگ پرچم Flag leaf length	0.44 **	0.16	1.00								
عرض برگ پرچم Flag leaf width	0.31 **	0.13	-0.01	1.00							
طول خوشه Panicle length	0.44 **	-0.12	0.35**	-0.17	1.00						
تعداد گلچه number of flowers	0.14	-0.23*	0.07	0.09	0.14	1.00					
تعداد دانه های بارور Filled grain number	-0.04	0.21	0.19	-0.18	-0.07	-0.16	1.00				
تعداد دانه عقیم Sterile grain number	0.22	-0.30*	0.08	0.17	0.11	0.87**	-0.37**	1.00			
طول دانه Grain length	0.13	0.08	0.15	0.03	0.34**	-0.15	-0.18	-0.05	1.00		
عرض دانه Grain width	0.09	-0.21	0.02	-0.26*	-0.10	-0.40**	-0.15	-0.21	-0.03	1.00	
درصد دگرگشتی cross fertilization (%)	-0.06	0.24*	0.14	-0.13	-0.06	-0.31*	0.97**	-0.50**	-0.08	-0.13	1.00

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و یک درصد، ns: غیر معنی دار

ns: Not significant, * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

۱/۱ برای تمامی لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی و نگهدارنده را ایجاد می‌نماید (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴). در این مطالعه، تمامی لاین‌های نرعیتم و نگهدارنده با استفاده از نشانگر RG136 یک قطعه ۱/۱Kb تولید کردند. در مقابل، با استفاده از نشانگر CMS، تنها یک قطعه ۳۸۶bp در لاین‌های نرعیتم CMS-WA ایجاد شد و در سایر لاین‌ها از جمله نرعیتم CMS، dissi و GAM و لاین ۵۱ TG و نگهدارنده‌های آن‌ها، هیچ باندی ایجاد نشد. لاین‌های IR58025A، فجر A، نعمت، ندا A، هراز A، دشت A، چمپا A، IR68902، IR79124 A

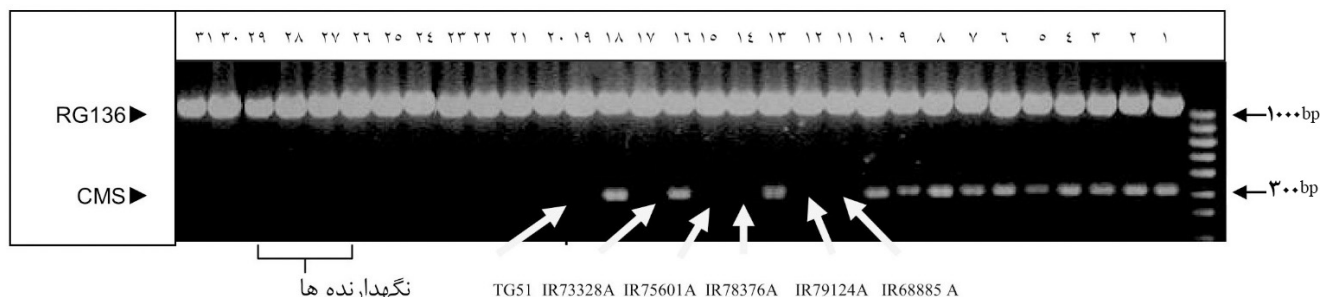
ارزیابی مولکولی لاین‌های نرعیتم سیتوپلاسمی و نگهدارنده های مربوط به آنها با استفاده از نشانگرهای

مولکولی مبتنی بر PCR

استفاده از نشانگر CMS به صورت ترکیبی با نشانگر RG136 نشانگر CMS یک نشانگر طراحی شده از آغازگر RM9 می‌باشد که یک قطعه ۳۸۶ جفت بازی از لاین‌های نرعیتم ایجاد می‌کند، در حالیکه هیچ باندی از نگهدارنده‌ها تولید نمی‌گردد. به منظور رفع این نقیصه و اطمینان از کارایی بهتر، در این مطالعه از آغازگر ترکیبی دیگری به نام RG136 استفاده شد که یک قطعه Kb

باندی نشان ندادند (شکل ۱)، مشخص می‌شود که از این دو نشانگر ترکیبی تنها برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی با سیستم WA می‌تواند کارآمد باشد.

IR78376 A، IR78378A، IR68897 A همگی با سیستم CMS-WA یک قطعه ۳۸۶bp را نشان دادند. از آن‌جا که لاین‌های IR68885A (موتانت)، IR79124 A (موتانت)، IR73328A (موتانت)، IR78376 A (GAM)، و لاین TG51 (dissi) به همراه تمامی نگهدارنده‌های موجود،



شکل ۱. الگوی بانندی ایجاد شده از نشانگرهای ترکیبی CMS و RG136: همه لاین‌ها با استفاده از نشانگر RG136 قطعه مونومورف نشان دادند. با نشانگر CMS تنها لاین‌های CMS-WA باند نشان داده ولی بقیه شامل diss، GAM، موتانت و لاین TG51 بانندی نشان ندادند.

Figure 1. Banding pattern obtained using combined CMS and RG136 markers: All lines showed monomorphic fragment using RG136 marker. Using the CMS marker, only CMS-WA lines showed a band, but the others including GAM, diss, mutant and TG51 line did not show a band.

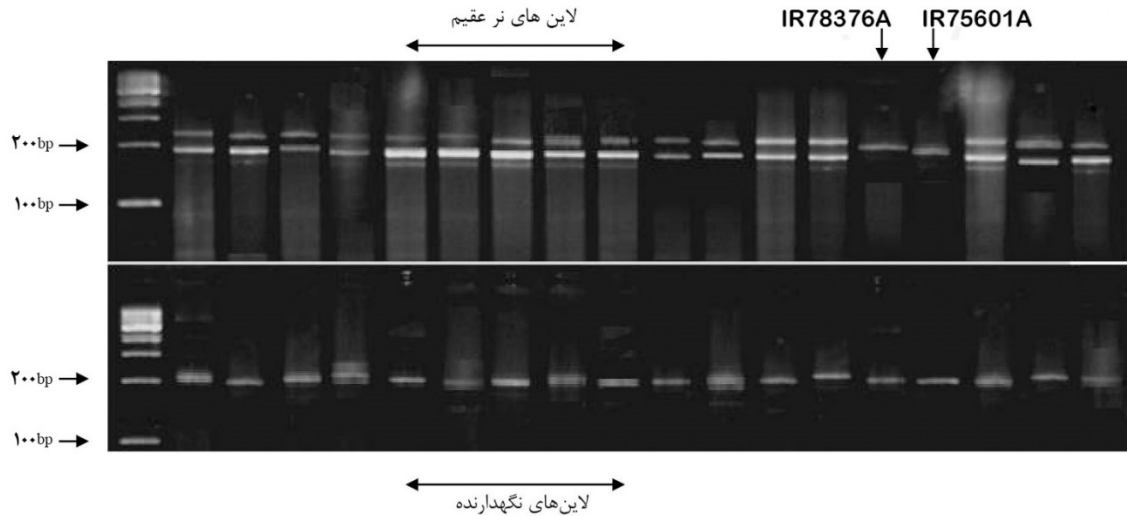
لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی متفاوت است. این نشانگر قادر به تمایز لاین‌های IR78376 A (GAM)، IR75601 (dissi) نگهدارنده‌های آنها نمی‌باشد.

نشانگر drrcms

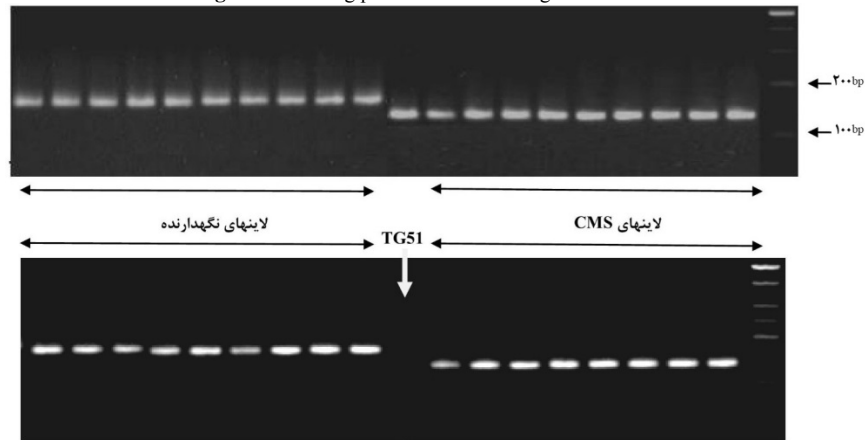
با انجام توالی‌یابی بر روی قطعات حاصل از نشانگر RMT6 و انجام بررسی‌های بیشتر، یک نشانگر به نام drrcms طراحی شد که توانایی تفکیک بین لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده آنها را دارد (راجندراکومار و همکاران، ۲۰۰۷). با اجرای واکنش PCR با استفاده از این آغازگر بر روی DNA ژنومی لاین‌های مورد استفاده در این تحقیق، قطعات بانندی با اندازه‌های مختلف برای لاین‌های نرعقیم (تقریباً ۱۵۰bp) و لاین‌های نگهدارنده (تقریباً ۱۵۷bp) مشاهده گردید (شکل ۳).

نشانگر RMT6

نشانگر RMT6 یک نشانگر است که در لاین‌های نرعقیم قطعات حدود ۱۹۷bp و ۲۱۱bp را تولید می‌کند. این نشانگر در لاین‌های نگهدارنده نیز یک قطعه حدود ۲۰۹bp تولید می‌نماید (راجندراکومار و همکاران، ۲۰۰۷). با استفاده از این نشانگر بر روی نمونه‌های DNA ژنومی لاین‌های مورد مطالعه، قطعات حدود ۱۹۷bp و ۲۱۱bp در لاین‌های CMS-WA و موتانت به دست آمد و یک قطعه ۲۰۹bp در تمامی لاین‌های نگهدارنده تولید گردید (شکل ۲). با این حال، در لاین‌های نرعقیم با سیستم‌های diss و GAM، قطعه ضعیف ۲۰۹bp حاصل گردید که ممکن است به دلیل تفاوت منابع سیتوپلاسمی و نرعقیمی باشد. همچنین، در مورد لاین TG51 هیچ بانندی مشاهده نشد و دلیل آن این است که این یک نرعقیم ژنتیکی است و با سایر



شکل ۲. الگوی بانندی ایجاد شده با نشانگر RMT6
Figure 2. Banding pattern obtained using RMT6 marker.



شکل ۳. الگوی بانندی ایجاد شده با نشانگر drrcms. لدر 100bp (100bp-500bp)
Figure 3. Banding pattern obtained using drrcms marker. 100bp ladder (100bp-500bp)

بحث و نتیجه‌گیری

لاین‌های نرعیتم با خصوصیات مورفولوژیکی مطلوب مانند ارتفاع کوتاه، تعداد پنجه بارور بالا و درصد دگرگشتی بالا می‌توانند در تولید بذر هیبرید برنج کارآمد باشند (چن و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین تشخیص اختلاط بذر لاین‌های نرعیتم و اطمینان از خلوص بذره‌های تولیدی برای حفظ یکپارچگی و کیفیت ارقام زراعی حیاتی است. نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای ضروری در این زمینه ظهور کرده‌اند و روشی دقیق و کارآمد برای شناسایی صفات ژنتیکی و تمایز بین ژنوتیپ‌های مختلف ارائه می‌دهند. نشانگرهای مولکولی مانند ریزماهورها (SSRs)، چندریختی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) و چندریختی طول قطعه تکثیرشده (AFLPs) راهکارهای منحصربه‌فردی را

همچنین، توانستیم این تمایز را برای لاین‌های نرعیتم سیستم‌های دیگر نیز مشاهده کنیم، که این امر توانایی گسترده استفاده از این نشانگر را برای بررسی خلوص لاین‌های والدینی هیبرید در منابع مختلف نشان می‌دهد. با این حال، در مورد لاین TG51 به دلیل متفاوت بودن نوع عقیمی آن، تمایزی حاصل نشد و باید از نشانگرهای اختصاصی‌تر استفاده شود. این نشانگر در مقایسه با نشانگرهای SSR که هتروزایگوتی را نشان می‌دهند، تنها یک باند ایجاد می‌نماید که تجزیه و تحلیل و استفاده از آن را آسان‌تر و گسترده‌تر می‌کند. به نظر می‌رسد این ویژگی در این نشانگر، سبب می‌شود که از آن در تشخیص اختلاط بذور لاین‌های نرعیتم و همچنین بررسی خلوص بذور تولیدی، به ویژه برای مؤسسات تولید بذر، استفاده شود و نیاز به آزمایش با روش‌های هزینه‌بر و زمان‌بر GOT را از بین ببرد.

۲۰۱۱). از اینرو نشانگر *drrecms* به دلیل سادگی و کارایی بالا، می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب برای بررسی خلوص ژنتیکی لاین‌های نرعقیم در مؤسسات تولید بذر مورد استفاده قرار گیرد. از جمله دیگر مزایای نشانگر *drrecms* می‌توان تمایز دقیق بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده نام برد که این نشانگر را به جایگزینی مناسب برای روش‌های مبتنی بر GOT تبدیل می‌کند.

پیشنهادات برای تحقیقات آینده

مطالعه و ارزیابی لاین‌های جدید نرعقیم سیتوپلاسمی در شرایط محیطی مختلف می‌تواند به درک بهتری از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رفتاری این لاین‌ها در مقابل متغیرهای محیطی کمک کند. همچنین، بررسی اثرات متقابل بین لاین‌های نرعقیم و لاین‌های نگهدارنده آنها می‌تواند اطلاعاتی ارزشمند درباره تأثیرات تعاملی بین این دو لاین ارائه دهد. همچنین برای مطالعات آینده با توجه به اینکه خصوصیات لاین‌های A و B ارزیابی شده است پیشنهاد می‌شود آزمون GOT با آزمون‌های نشانگرهای ملکولی مقایسه و بر اساس آزمون GOT دقت نشانگرهای مورد ارزیابی قرار گیرد.

همچنین بر اساس یافته‌های این تحقیق پیشنهاد می‌شود لاین‌های نرعقیم IR58025A، ندا A، فجر A، و لاین نگهدارنده دشت A به عنوان نگهدارنده برای لاین نرعقیم خودشان مورد توجه قرار گیرند. همچنین می‌توان از نشانگر ملکولی *drrecms* با موفقیت برای تمایز لاین‌های *cms* و نگهدارنده آنها و نیز تشخیص اختلاط بذر *cms* از منابع مختلف نرعقیم سیتوپلاسمی در لاین‌های نرعقیم ایرانی استفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که لاین TG51 و سایر لاین‌های این گروه نیاز به بررسی جداگانه و اختصاصی دارند و نیز بررسی کامل خصوصیات این لاین‌ها، از جمله مورفولوژی و آلوگامی، امکان ارزیابی جامع و دقیق در زمینه بهبود ژنتیکی و استفاده اثربخش آنها در تولید بذر را فراهم می‌کند.

سپاسگزاری

این مقاله نتایج پروژه تحقیقاتی ۹۷۰۴۶۶-۰۲۰-۰۴-۰۴-۰۴ مصوب مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی می‌باشد. از تمام افرادی که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

ارائه می‌دهند که می‌توان از آنها برای ایجاد تمایز در زمینه‌های ژنتیکی مختلف بهره برد (چودهری و همکاران، ۲۰۲۲). نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) ابزاری مهم در تولید بذر هیبرید برنج است با این حال، لاین‌های نرعقیم به دلیل عقیم، نیاز به گرده افشانی دستی دارند و تکثیر آنها دشوار است. در این مطالعه، خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی ۱۹ لاین جدید نرعقیم سیتوپلاسمی و لاین‌های نگهدارنده آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد نشانگر CMS که شامل آغازگر RM9 است، برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی با سیستم WA از سایر لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده‌ها کارآمد نیست. این نشانگر فقط یک قطعه 386bp در لاین‌های نرعقیم WA-CMS ایجاد می‌کند، در حالی که در سایر لاین‌های نگهدارنده هیچ باندهای ایجاد نمی‌شود. در مقابل، نشانگر ترکیبی RG136 که توسط یاشیتولا (یاشیتولا و همکاران، ۲۰۰۴) معرفی شد، برای تمایز لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی و نگهدارنده‌ها از یکدیگر موثرتر بود. مطالعات نشان داده است نشانگرهای ملکولی مانند نشانگر CMS و نشانگر RG136 در ترکیب با هم می‌توانند برای تأیید خلوص و شناسایی بذر هیبریدی استفاده شوند (گو و همکاران، ۲۰۲۲). استفاده ترکیبی از این نشانگرها محققان را قادر می‌سازد تا با ایجاد پروفایل‌های مولکولی، هیبریدهای واقعی را در بذر از ناخالصی‌ها متمایز کنند (نایاک و همکاران، ۲۰۱۵). این رویکرد اصالت دانه‌های هیبریدی را تضمین می‌کند که برای تولید و توزیع بذر تجاری حیاتی است. تکثیر نشانگر RMT6 نیز در بین انواع مختلف لاین‌های برنج CMS و نگهدارنده نشان دهنده چند شکلی بین تمام لاین‌های WA-CMS و نگهدارنده‌های آنها بود که دو قطعه در لاین CMS و یک قطعه را در لاین نگهدارنده تکثیر می‌کرد (کوشتا و همکاران، ۲۰۱۴). با این وجود در مطالعه ما این نشانگر قادر به تمایز لاین‌های IR75601 (dissi)، IR78376 A (GAM) از نگهدارنده‌های آنها نبود. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نشانگر توسعه یافته *drrecms* نسبت به نشانگر CMS که توسط یاشیتولا معرفی شد، برتری قابل توجهی دارد. این برتری به این دلیل است که این نشانگر می‌تواند بر اساس اندازه‌های متفاوت قطعات، لاین WA-CMS را از نگهدارنده‌های خویشاوند آنها تشخیص دهد، در حالی که نشانگر CMS نیاز به ترکیب شدن با یک نشانگر اختصاصی ژنوم هسته‌ای دیگر دارد (رودونی و همکاران،

References

- Ahmadikhah, A., Mirarab, M., Pahlevani, M. H., & Nayyeripasand, L. (2015). Marker-assisted backcrossing to develop an elite cytoplasmic male sterility line in rice. *The Plant Genome*, 8(2), plantgenome2014-07.
- Akagi, H., Yokozeki, Y., Inagaki, A., and Fujimura, T. (1996). Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1071–1077.
- Alavi, M., Ahmadikhah, A., Kamkar, B, and Kalateh, M. (2009). Mapping Rf3 locus in rice by SSR and CAPS markers. *International Journal of Genetics and Molecular Biology.* 1(7): 121-126.
- Chen, Y., Shahid, M. Q., Wu, J., Deng, R., Chen, Z., Wang, L., ... & Liu, X. (2022). Thermo-sensitive genic Male sterile lines of neo-tetraploid rice developed through gene editing technology revealed high levels of hybrid vigor. *Plants*, 11(11), 1390.
- Choudhury, A., Deb, S., Kharbyngar, B., Rajpal, V. R., & Rao, S. R. (2022). Dissecting the plant genome: through new generation molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(8), 2661-2698.
- Guanghua, H., Lei, H., Yuehua, X., Xiaoying, L., Guoqing, N., Guangwei, Y., and Yan, P. (2003). A common sequence difference between cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines existing in rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast tRNA-Leu gene region. *Euphytica* 131: 269–274.
- Guo, Y., Li, B., Li, M., Zhu, H., Yang, Q., Liu, X., ... & Wang, T. (2022). Efficient marker-assisted breeding for clubroot resistance in elite Pol-CMS rapeseed varieties by updating the PbBa8. 1 locus. *Molecular Breeding*, 42(7), 41.
- Hossain, M. (1996). Economic prosperity in Asia: Implications for rice research. P. 316. In G.S. Khush (ed.) *Rice Genetics III, Proc.Third Intl. Rice Genet. Symp., Los Ban~ os, Manila, the Philippines.* 16–20 Oct. 1995. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines.
- Ichii, M., Hong, D.L., Ohara, Y., Zhao, C.M., and Taketa, S. (2003). Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica.* 129: 249–252.
- Ingale, B.V., Waghmode, B.D., and Hodawadekar, S.S. (2008). Identification of Restorers and Maintainers for different CMS Lines of Rice. *Madras Agric. J.* 95 (7-12): 266-277.
- IRRI. (1994). Lecture notes. *Asian Rice Biotechnology Network* (ARBN).
- Jena, K.K., and Pandey, S.K. (1999). DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. *Hybrid Rice News.* 12:13-14.
- John Newbury, H. (2003). *Plant molecular breeding.* P. 52.
- Kochert, G., Tanksley, S. D., & Price, J. P. (1989). RFLP training course laboratory manual. *Rockefeller Program on Rice Biotechnology, Cornell Univ., Ithaca, NY*, 5-6.
- Komori, T., & Nitta, N. (2004). A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. *Plant Breeding*, 123(6), 549-553.
- Koshta, N., Tetwar, S., & Yadav, P. (2014). Marker Assisted Selection in Hybrid Rice Breeding. *Biosciences*, 1357.
- Mao, C.X., Virmani, S.S., & Kumar, I. (1996). Technological innovations to lower the costs of hybrid rice seed production. P. 111–128.
- McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., ... & Blair, M. (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Oryza: from molecule to plant*, 89-99.
- Nadakumar, N., Singh, A. K., Sharma, R. K., Mohapatra, T., Prabhu, K. V., and Zaman, F. U. (2004). Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.
- Narayanan, K.K., Senthilkumar, P., Venmadhi, S., Thomas, G., and Thomas, J. (1996). *Molecular genetic studies on the rice mitochondrial genome.* P. 689-695.
- Nayak, D. K., Pandit, E., Mohanty, S., Barik, D. P., & Pradhan, S. K. (2015). Marker-assisted selection in back cross progenies for transfer of bacterial leaf blight resistance genes into a popular lowland rice cultivar. *ORYZA-An International Journal on Rice*, 52(3), 163-172.
- Pha, N. T., & Lang, N. T. (2004). Marker assisted selection in rice breeding for bacterial leaf blight. *Omon rice*, 12, 19-26.
- Rajendran, N., Gandhimani, R., Singh, S., and Palchamy, K. (2007). Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica.* 156: 129–139
- Rudnoy, S., Paldi, E., Bratek, Z., Laszti, D., & Racz, I. (2011). Detection of genome-specific ribosomal DNA sequences from bread wheat by a modified PCR-based method.
- Samonte, S. O. P. B., Wilson, L. T., & Medley, J. S. (2010). Heterosis in pre-heading yield-related rice traits. *Texas Rice*, 10(1), 7-11.
- Paroda, R. S. (1998). Priorities and opportunities of rice production and consumption in India for self-sufficiency. *Sustainability of rice in the global food system*, 357-390.
- Rajendran, N., Gandhimani, R., Singh, S., & Palchamy, K. (2007). Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 156(1-2), 129-139.
- Sane, A. P., Seth, P., Ranade, S. A., Nath, P., & Sane, P. V. (1997). RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice. *Theoretical and applied genetics*, 95, 1098-1103.

- Sattaryi, M. (2018). Study of quantitative traits and cooking quality of some hybrid rice cultivars in Mazandaran province. *The 18th National Rice Conference*, Sari.
- Sundaram, R. M., Naveenkumar, B., Biradar, S. K., Balachandran, S. M., Mishra, B., IlyasAhmed, M., ... & Sarma, N. P. (2008). Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica*, 163, 215-224.
- Siyah Chehreh, Muhammad. Kayani, Ghaffar. Sattari, Majid., Kazemi Tabar, Kamal. Nawabpour, Saeed. (2023). Characterization of temperature-sensitive male sterility gene (TGMS) in Nemat mutant rice. *Agricultural Plant Breeding Journal*, 15(45), 164-171
- Thiyagarajan, K., Manonmani, S., Malarvizhi, D., Robin, S., Pushpam, R., & Sundaram, K. M. (2010). Development of new TGMS lines with good floral traits in rice. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4), 568-571.
- Verma, M. M. (1996). Procedures for grow-out test (GOT). *Seed Technol. Newsl*, 26, 1-4.
- Virmani, S. S. (2003). Advances in hybrid rice research and development in the tropics. *Hybrid rice for food security, poverty alleviation, and environmental protection*, 7-20.
- Virmani, S. S., & Kumar, I. (2004). Development and use of hybrid rice technology to increase rice productivity in the tropics. *International Rice Research Notes*, 29(1), 10-19.
- Wen, L., Liu, G., Li, S. Q., Wan, C. X., Tao, J., Xu, K. Y., ... & Zhu, Y. G. (2007). Proteomic analysis of anthers from Honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid. *Botanical Studies*, 48(3), 293-309.
- Ye-Yun, X., Zhan, Z., Yi-Ping, X., & Long-Ping, Y. (2005). Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers. *Rice Science*, 12(1), 7.
- Yan, W. (2000). Crop heterosis and herbicide. *United States Patent*, 6,066, 779.
- Yashitola, J., Thirumurugan, T., Sundaram, R. M., Naseerullah, M. K., Ramesha, M. S., Sarma, N. P., & Sonti, R. V. (2002). Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Science*, 42(4), 1369-1373.
- Yashitola, J., Sundaram, R. M., Biradar, S. K., Thirumurugan, T., Vishnupriya, M. R., Rajeshwari, R., ... & Sonti, R. V. (2004). A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintainer lines. *Crop science*, 44(3), 920-924.
- Yuan, L. P. (1995). Current status of hybrid rice in China and future strategies for 21st century. *Hybrid rice seed production technology. Directorate of Rice Research, Hyderabad, India*, 31-33.

ORIGINAL ARTICLE

Structure and similarity of dehydrin proteins using bioinformatics tools in monocotyledons and dicotyledons plants

Armin Saed-Moucheshi, Ali Shirkhani*

Crop and Horticulture Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Kermanshah, Iran.

Correspondence

Ali Shirkhani
Email: Ali.shirkhani@gmail.com

How to cite

Saed-Moucheshi, A., & Shirkhani, A. (2024). Structure and similarity of dehydrin proteins using bioinformatics tools in monocotyledons and dicotyledons. *Crop Biotechnology*, 13(46), 59-73.

ABSTRACT

Dehydrin (DHN) proteins are a group of proteins that effectively respond to abiotic stresses such as cold and drought stress in plants. These proteins are a subset of protective greater group of proteins called type II Late embryogenesis abundant which are protecting other proteins from stresses shock. Due to the significant effect of dehydrin proteins in plants, specially under abiotic stresses, the aims of this study were to survey the linear structure along with phylogeny relationship of this proteins' group in different plants species. The protein linear sequences of different plant species were downloaded from NCBI site and then were aligned using MegaX software. The results of aligning showed highly conserved segments within the considered sequences such as K- and S-segments that are respectively responsible for covering other proteins and protecting them from damaging effects of stresses and transporting dehydrin proteins from cytoplasm to nucleus. Using the sequences' alignment, phylogenetic tree was extracted using Neighbor joining method. Furthermore, linear sequence order of amino acids and their ratio in the structure of these protein were evaluated. Following that, the composition of these proteins genomic sequences were considered to compare with the results of amino acids evaluation. The results indicated that dicotyledon and monocotyledon plants can be clearly separated into two distinguished classes based on the amino acid structure of DHN proteins. Similarly, The ratio and order of DNHs linear sequences were distinctly altered between mono- and di-cotyledon plants. Evaluation of genomic base pairs of these proteins showed that there are numerous unchanged motifs with eighter no or a little difference shared among the genomic sequences of DHN proteins.

KEYWORDS

DNH genomic sequences, K-segment, S-segment, Late embryogenesis abundant proteins, Neighbor Joining.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی ساختار و قرابت پروتئین‌های دهیدرین توسط ابزارهای بیوانفورماتیک در گیاهان تک‌لپه و دولپه

آرمین ساعدموجشی، علی شیرخانی*

چکیده

پروتئین‌های گروه دهیدرین (Dehydrin: DHN)، گروهی از پروتئین‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند سرما و خشکی در گیاهان هستند. این پروتئین‌ها به گروهی از پروتئین‌های محافظت‌کننده از سایر پروتئین‌ها به نام type II Late embryogenesis abundant تعلق دارند. با توجه به اهمیت پروتئین‌های گروه دهیدرین در گیاهان، در این تحقیق روابط تکاملی این گروه در گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور توالی‌های پروتئین‌های دهیدرین گیاهان مختلف از سایت NCBI استخراج و هم‌ردیف گردید. نتایج وجود نواحی حفاظت‌شده از جمله موتیف K و S که به ترتیب در واکنش با دیگر پروتئین‌های تحت تنش و محافظت از آن‌ها و همچنین انتقال پروتئین‌های گروه دهیدرین از سیتوپلاسم به هسته نقش دارند را در بین ژن‌های مورد بررسی نشان داد. درخت فیلوژنی بر پایه نواحی حفاظت‌شده و با روش Neighbor Joining رسم گردید و توالی خطی و درصد اسیدآمین‌های موجود در ساختار این پروتئین‌ها به همراه توالی مکمل ژنومی آن‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین‌های گروه دهیدرین دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای‌ها به دو گروه مجزا تفکیک شده و در هر گروه نیز بر اساس نزدیکی و دوری جنس‌های مختلف گیاهی در کلاسترهای مجزا قرار گرفتند. همچنین گیاهان تک‌لپه از لحاظ توالی خطی اسیدآمین‌ها و درصد آن‌ها هم اختلاف بالایی را نشان دادند. از طرفی، بررسی توالی ژنومی این گیاهان نشان‌دهنده وجود ساختارهای حفاظت‌شده و مشابه بود.

واژه‌های کلیدی

تنش غیر زیستی، موتیف‌های S و K، پروتئین‌های Late embryogenesis abundant، Neighbor Joining.

بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:

علی شیرخانی

رایانامه: Ali.shirkhani@gmail.com

استناد به این مقاله:

آرمین و شیرخانی، علی (۱۴۰۳). بررسی ساختار و قرابت پروتئین‌های دهیدرین توسط ابزارهای بیوانفورماتیک در گیاهان تک‌لپه و دولپه. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۷۳-۵۹.

مقدمه

فیلوژنی یا تبار شناختی به بررسی و تعیین روابط خویشاوندی تاکسون‌ها، خطوط اجدادی و منشأ پیدایش گیاهان می‌پردازد. در فیلوژنی علاوه بر صفات ریخت‌شناختی از داده‌های مولکولی مثل توالی DNA موجود در هسته، کلروپلاست و یا میتوکندری استفاده می‌شود. امروزه سعی می‌شود جهت بررسی روابط تکاملی و فیلوژنی به‌جای اطلاعات ریخت‌شناسی، از اطلاعات حاصل از توالی DNA و پروتئین‌ها استفاده شود. هر نوکلئوتید یا اسیدآمینو می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی جهت بررسی روابط فیلوژنی در نظر گرفته شود. در مقایسه با اطلاعات ریخت‌شناسی، امتیاز دادن به این نوع اطلاعات ژنتیکی هم ساده‌تر است و هم اطلاعات بیش تری در اختیار قرار می‌دهند (Sheikh Asadi et al., 2019). تنوع در جایابی پروتئین‌های درون سلول می‌تواند منجر به ایجاد یک عملکرد جدید و یا تفکیک عملکرد گردد و نقش مهمی در تکامل ژنوم‌های یوکاریوتی داشته‌باشد. تشخیص جایابی یک پروتئین در اجزای درون سلولی عملکرد بیولوژیکی آن آنزیم را تا حدود زیادی مشخص می‌کند و بینش مناسبی از مسیر تکاملی خانواده ژنی گیاهان را فراهم می‌کند (Farah Yachash et al., 2019).

پروتئین‌های گروه دهیدرین (DHN: Dehydrin)، گروهی از پروتئین‌های مهم هستند که در پاسخ به تنش غیر زیستی مانند تنش سرمایی و تنش خشکی در گیاهان تولید می‌گردند. این پروتئین‌ها جزء گروهی از پروتئین‌های محافظت‌کننده از سایر پروتئین‌ها هستند که به گروه Late embryogenesis type II (LEA) abundant تعلق دارند (Yang et al., 2012). دهیدرین پروتئین‌های آب‌دوست بوده و در برابر حرارت مقاوم‌اند. این پروتئین‌ها دارای گلاسیین و سایر آمینواسیدهای قطبی بوده و معمولاً یک کپی از توالی توافقی ۱۵ آمینواسیدی را دارند که غنی از آمینواسید لایزین بوده (EKKGIMDKIKEKPLG) و تا حدود زیادی در گونه‌های گیاهی حفاظت‌شده است (Chang-Cai et al., 2012). از سال ۱۹۸۹ که برای اولین بار این پروتئین‌ها در جو و ذرت مشاهده گردید، به‌عنوان پایه ژنتیکی مقاومت به خشکی شناخته می‌شود (Close et al., 1989).

برای شناسایی قطعی نحوه عمل این پروتئین‌ها، آزمایشی با روش خاموش‌سازی ژنی که ارتباط مستقیم با عملکرد پروتئین‌های دهیدرین داشت انجام گرفت و مشخص گردید که گیاهان شاهد می‌توانند بعد از تنش شوری (که باعث ایجاد تنش اسموتیک می‌شود) و پس از آن بازبازی از تنش تا ۹۴ درصد وزن‌تر

معمول را بازبازی کنند درحالی‌که گیاهان جهش داده‌شده تنها تا ۳۴ درصد وزن‌تر معمول خود را بازبازی کردند (Saavedra et al., 2006). همچنین در یک آزمایش دیگر مشاهده گردید که میزان بیان پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مختلف مقاوم به خشکی در مقایسه با گیاهان غیر مقاوم به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (Velasco-Conde et al., 2012). مکانیسم عمل این گروه از پروتئین‌ها هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است ولی چنین به نظر می‌رسد که یک رابطه مستقیم بین هورمون آبسزیک اسید به‌عنوان یک سیگنال در پاسخ به تنش‌های محیطی و تولید دهیدرین در گیاهان وجود دارد به‌طوری‌که این هورمون باعث افزایش تولید این گروه از پروتئین‌ها می‌گردد که شاهدهی جهت تأیید کارکرد دهیدرین‌ها در شرایط تنش است (Borovskii et al., 2002).

سان و همکاران اعلام نمودند که در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی (مانند خشک‌سالی، تنش اسمزی، شوری و دما)، بسیاری از ژن‌های DHN در تمام بافت‌های رویشی تنظیم می‌شوند. Smith and Graether (۲۰۲۲) نیز معتقدند که بیان افزایشی یک پروتئین^۱ LEA عموماً در پاسخ به حداقل یکی از سه تنش غیر زیستی، خشکی، سرما و استرس اسمزی رخ می‌دهد که همگی منجر به تخلیه آب درون سلولی می‌شوند و LEA حتی در بافت رویشی خشک‌شده نیز بیان می‌شود. این امر در مورد همه موجودات موجود در قلمرو گیاهی، از جمله گیاهان غیر آوندی نیز صادق است. با این حال، جلبک‌های سبز پروتئین‌های LEA کمتری در ژنوم خود دارند، افزون بر این، اسید آبسزیک (ABA)، هورمونی که در بلوغ جنین‌ها نقش دارد، در تنظیم مثبت برخی از پروتئین‌های LEA نقش دارد (Smith & Graether, 2022). ژنوم‌های گیاهی اغلب چندین خانواده پروتئین LEA را رمزگذاری می‌کنند که لزوماً در پاسخ به تنش‌های یکسان تنظیم نمی‌شوند و می‌توانند برای مراحل خاصی از رشد منحصربه‌فرد باشند (Lan et al., 2013) رابطه تکاملی بین ساختارهای مختلف گروه پروتئین‌های دهیدرین تا به امروز به‌طور کامل مشخص نشده است. انجام این کار به‌دلیل تعداد متغیر موتیف‌های حفاظت‌شده دشوار است، بنابراین دستیابی به هم‌ترازی‌های دقیق توالی چندانکه لازم برای مطالعات فیلوژنتیک را بسیار چالش برانگیز می‌کند. با این حال، چندین مطالعه در حال حاضر موجود است که ژنوم گیاهان مختلف (برنج، گندم، کیوی، لوکو، سیب زمینی) را با هدف شناسایی دهیدرین‌ها و ترسیم شجره

فیلوژنتیک به منظور درک بهتر تکامل آن‌ها در آن گیاه مورد تجزیه و تحلیل قرار داده‌اند. اغلب این مطالعات نشان دهنده اثر مهم جهش مضاعف و داخل شدن قطعه یا تکه‌های تکراری ژنومی مشابه به دورن ژن‌های دهیدرین به عنوان عامل اصلی در تنوع بخشیدن به پروتئین‌های این خانواده هستند. همچنین یک مطالعه دیگر که روی تک گونه گیاهی از خانواده Pinaceae تمرکز داشته است موفق به شناسایی قطعه ایی ژنومی به نام N1 شد که در درحال حاضر نام آن به قطعه F تغییر یافته است (Liu et al., 2012; Verma et al., 2017; Zan, Li, Li, Zhang, & Li, 2020; Zhang et al., 2021). در یکی از جامع‌ترین مطالعات خانواده‌محور در گیاهان که روی خانواده Pinaceae متمرکز بود، نویسندگان بخشی از ژنوم در آن زمان به نام N1 نام گذاری شد را شناسایی کردند که اکنون این بخش به عنوان بخش F شناخته می‌شود. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک در این پژوهش نشان داد که دهیدرین‌های Pinaceae به دو گروه تقسیم می‌شوند، در گروه دوم، دهیدرین‌های FKn و Kn هر کدام به دو کلاد تقسیم می‌شوند که نشان دهنده از دست دادن موازی موتیف های توالی است (Stival Sena et al., 2018).

دهیدرین‌ها در بافت‌های مختلف گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون از جمله خشکی، یخ‌زدگی، شوری و حتی فلزات سنگین همراه با افزایش سنتز آبسزیک‌اسید سنتز می‌شوند (Hanin et al., 2011). برخی از انواع پروتئین‌های دهیدرین نقش حفاظتی مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی دارند (Tripepi et al., 2011). گیاهان می‌توانند از طریق ژن‌هایی مانند دهیدرین در برابر خشکی مقاومت نشان دهند. این ژن در برابر تنش‌های خشکی، شوری و سرما واکنش نشان می‌دهد (Battaglia et al., 2008). این پروتئین‌ها ضمن محافظت سلول در برابر تنش خشکی، مانع واسرشته شدن ماکرو مولکول‌ها شده و سبب حفظ ساختار غشای سلولی می‌شوند (Sun et al., 2009).

سنتز و انباشت دهیدرین‌ها نه تنها در پاسخ به تنش، بلکه به عنوان بخشی از وقایع از پیش برنامه‌ریزی شده در طی مراحل نهایی تکوینی دانه در گیاهان روی می‌دهد (Jiménez-Bremont et al., 2013). آن‌ها ظرفیت هیدراتاسیون بالایی از خود نشان می‌دهند و همچنین می‌توانند مقادیر زیادی کاتیون را متصل کنند، آب را در سلول‌های خشک‌کننده نگه‌دارند و از عدم تعادل یونی و دنا توره شدن پروتئین جلوگیری کنند (Decena et al., 2021).

بیشترین محل حضور ژن دهیدرین درون هسته، سیتوپلاسم و اندامک‌هایی مثل کلروپلاست و میتوکندری است (Velasco

Conde et al., 2012). در حالت عادی، دهیدرین درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست فعالیت ندارد، اما افزایش بیان آن تحت شرایط خاص درون اندامک سیتوپلاسم و کلروپلاست رخ می‌دهد. در برخی منابع مکانیسم مقاومت به خشکی پروتئین‌های Lea بدین شکل تشریح شده‌است که در شرایط دهیدراتاسیون به صورت سازه‌های پروتئینی متشکل از ماریپچ آلفا شروع به نفوذ در ساختمان غشاء سلولی می‌نمایند. پس از ورود این پروتئین‌ها در ساختمان غشاء وضعیت ترمودینامیکی غشاء در اثر کنار هم قرار گرفتن ساختارهای آب‌گریز غشاء که ناشی از برهم‌کنش‌های گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز غشاء است، تغییر می‌نماید. این بدان معنی است که ساختار ماریپچ آلفای پروتئین دهیدرین در تعامل با لایه‌های فسفولیپیدی قرار می‌گیرد و ضخامت غشاء سلولی را افزایش می‌دهد و باعث مقاومت سلول به تنش خشکی و پدیده دهیدراتاسیون می‌شود (Yousef Zaei et al., 2019).

از آنجاکه مطالعات بسیار محدودی در رابطه با ساختار و روابط این گروه از پروتئین‌ها در گیاهان صورت گرفته‌شده و از طرفی این پروتئین‌ها دارای اهمیت بالایی در گیاهان هستند، مطالعه حاضر سعی در بررسی ساختار و روابط تکاملی و همچنین ارزیابی قرابت پروتئین‌های گروه دهیدرین در گیاهان تک‌لپه و دو لپه را دارد.

مواد و روش‌ها

توالی مربوط به نوکلئوتیدی و پروتئین‌های خانواده دهیدرین (DHN1) در آرآبیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) دانلود گردید و پس از آن توالی‌های گروه دهیدرین بر اساس شباهت با ژن دهیدرین آرآبیدوپسیس (Danyluk, Houde, Rassart, & Sarhan, 1994) و با استفاده از بلاست پروتئیناز سایت NCBI استخراج گردید. همه توالی‌های دارای شباهت با توالی‌های دهیدرین آرآبیدوپسیس، تک‌تک در سایت NCBI چک شد و در صورتی که هر کدام از توالی‌های مربوط به گروه دیگر یا دارای عملکردی غیر مرتبط با این گروه بودند حذف گردید. همچنین، مرحله آخر جهت انتخاب توالی‌های اندازه‌گیری میزان شباهت آن‌ها با توالی دهیدرین آرآبیدوپسیس بود که بر این اساس توالی‌ها مجدد در سایت NCBI بلاست گردید و توالی‌های دارای شباهت بیشتر از ۴۰ درصد انتخاب شدند. برای بررسی روابط تکاملی و فیلوژنی توالی‌های منتخب الاینمنت آن‌ها با استفاده از روش ClustalW و با الگوریتم ماتریس وزنی BLUSOM و نیز روش

ها در برمی‌گیرد تا از تخریب به‌وسیله تنش محافظت شوند (Hanin *et al.*, 2011). یکی دیگر از موتیف‌های مهم و کارکردی در دهیدرین‌ها موتیف S است که می‌تواند به‌وسیله کاسین کاینز ۲ (casein kinase II;CK2) دچار تغییرات پس از ترجمه‌ای مانند فسفوریلاسیون شود که این تغییرات در انتقال آن‌ها از سیتوپلاسم به هسته سلول نقش ایفا می‌کند. با این حال وجود پروتئین‌های دهیدرینی که فاقد موتیف S هستند نیز در داخل هسته سلول گزارش گردیده است (Hanin *et al.*, 2011). چنین به نظر می‌رسد که این نواحی حفاظت‌شده وظیفه اصلی و کارکردی این پروتئین‌ها در واکنش به تنش را بر عهده‌دارند به‌طوری‌که در طی تکامل به‌طور حفاظت‌شده باقیمانده‌اند. در شکل ۲ می‌توان نزدیکی فاصله خطی دو ناحیه K و S در ترکیبات اسیدآمینه گیاهان مختلف و همچنین تفاوت ساختاری آن‌ها را مشاهده نمود.

روابط فیلوژنی و رسم درخت تکاملی مرتبط با پروتئین‌های دهیدرین در شکل ۳ نشان داده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد که گیاهان دولپه و تک‌لپه قادرند بر اساس فاصله ژنتیکی محاسبه شده از ماتریکس‌های ژنتیکی به‌خوبی از هم جدا گردند. جهت نمایش ساختاری فاصله ژنتیکی بین گیاهان دولپه و تک‌لپه شکل ۴ با تقسیم‌بندی این دو گروه بر اساس توالی اسیدآمینه مربوط به پروتئین‌های خانواده دهیدرین به نمایش درآمده‌است. فیلوژنی و گروه‌بندی ساختاری گیاهان بر اساس این گروه از پروتئین‌ها نشان‌دهنده شباهت بیشتر نواحی پروتئینی توالی گیاهان موجود در یک جنس نسبت به سایر جنس‌ها را به وضوح نشان می‌دهد (شکل ۳ و شکل ۴).

بیشترین شباهت در تک‌لپه‌ای‌ها مربوط به گندم نان و گندم دوروم است که می‌توان آن را در بررسی طول خط‌های نشان دهنده فاصله ژنتیکی در درخت فیلوژنی موردبررسی در شکل ۳ مشاهده نمود؛ بنابراین چنین به نظر می‌رسد که توالی پروتئین‌های دهیدرین در گندم نان و دوروم تا مدت‌زمانی طولانی تحت فشار تکاملی یکسانی قرار داشته‌اند. آزیلپوس نیز که از اجداد گندم است به‌همراه آگروپایرون بافاصله کمی در گروه مشابه گندم نان و دوروم قرار گرفته و بعد از آن جو با فاصله بیشتری نسبت به این گروه قرار گرفته‌است. شباهت سورگوم و ذرت نیز بالا بوده و در کنار هم در یک گروه قرار گرفته‌اند. گونه‌های مختلف برنج و براکیبودیوم نیز با فاصله از آن‌ها در یک زیرگروه دیگر قرار گرفتند و در نهایت زیرگروه‌های تک‌لپه‌ای با هم پیوند خورده و به‌صورت واضحی از دولپه‌ای‌ها متمایز گردیدند.

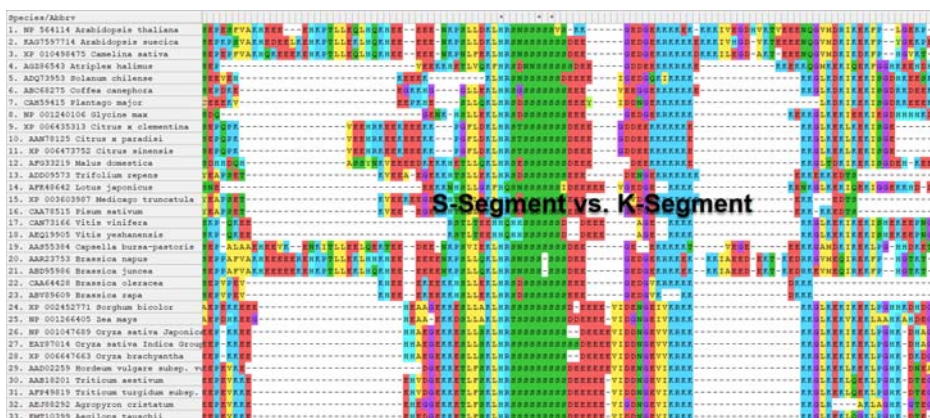
MUSCLE با الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار MEGA11 انجام شد. چون تعداد توالی‌های مشابه با روش MUSCLE بیشتر بود و توانایی بیشتری برای تشخیص شباهت توالی را نشان داد، در نهایت از روش MUSCLE و الگوریتم UPGMA جهت بررسی فیلوژنی این توالی‌ها استفاده گردید. در زمان الاینمنت کردن توالی‌ها، توالی‌هایی که دارای طول‌های کوتاه بودند و یا همولوژی پایینی را از لحاظ موتیفی با سایر پروتئین‌ها دارا بودند حذف شده و مجدداً الاینمنت برای توالی‌های باقی‌مانده برای تعیین روابط فیلوژنتیکی انجام گرفت. رسم نهایی درخت فیلوژنی با استفاده از توالی پروتئین‌های انتخابی با روش Neighbor Joining و با Bootstrap هزار در نرم‌افزار MEGA11 (جهت نصب این نرم‌افزار می‌توان به سایت <https://www.megasoftware.net> مراجعه نموده و بر اساس نوع سیستم‌عامل فایبل نصب نرم‌افزار را دانلود کرد) انجام گردید. توالی‌های آمینواسیدی و درصد ترکیبات آن‌ها در پروتئین‌های گروه دهیدرین برای هر گونه گیاهی با استفاده از نرم‌افزار مگا انجام شد و در نهایت از این نسبت‌های آمینواسیدی جهت گروه بندی روابط تکاملی گونه‌های مورد بررسی استفاده گردید. از نرم افزار R جهت استخراج همبستگی و پلات همبستگی بین گونه‌ها و آمینواسیدها استفاده گردید. همچنین کلاسترینگ و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز با استفاده از پکیج‌های مربوط به نرم‌افزار R استفاده شد.

نتایج و بحث

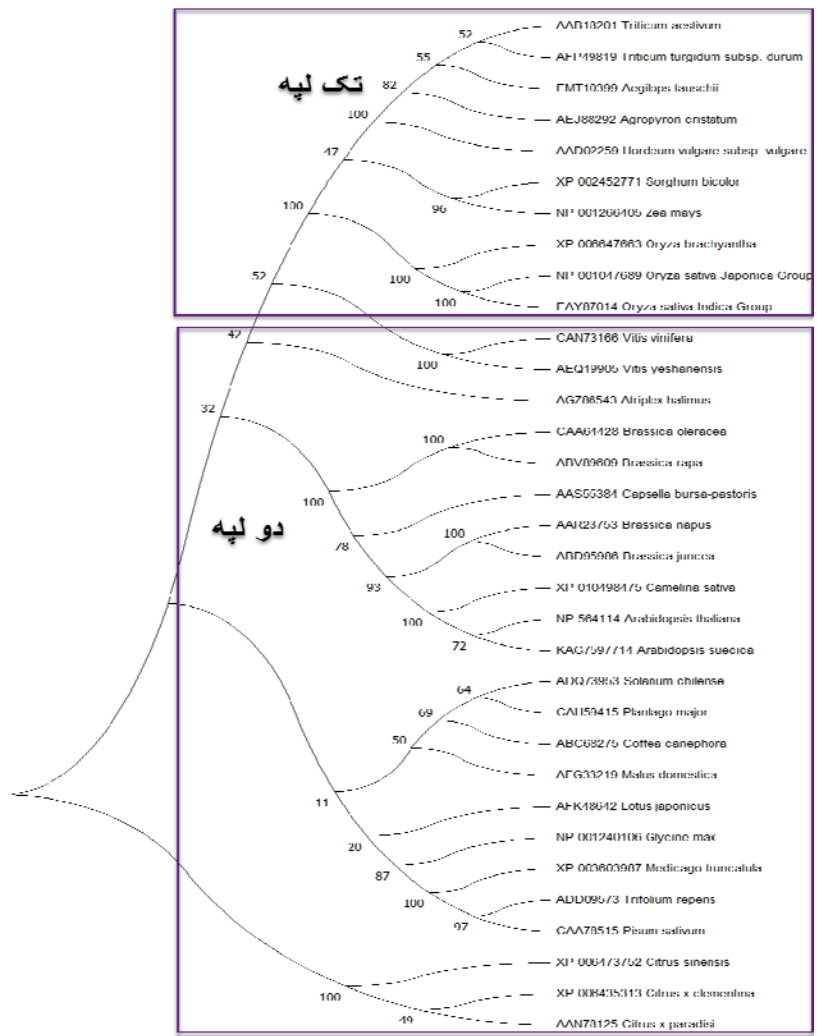
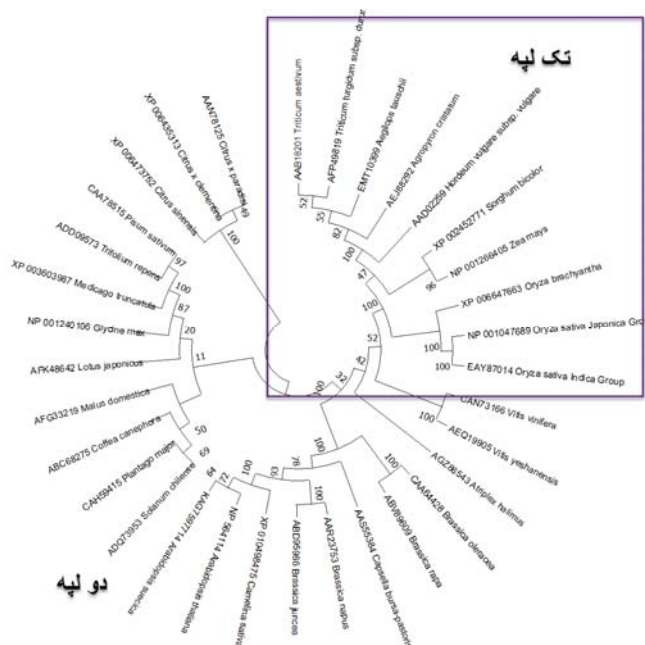
جهت بررسی ساختار و کارکرد پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مختلف در این مطالعه از تعداد ۱۰۰ توالی پروتئینی مربوط به پروتئین‌های گروه دهیدرین یافت شده در NCBI، توالی مربوط به تعداد ۳۳ گونه گیاهی که دارای بالاترین شباهت به ژن دهیدرین گندم بودند انتخاب و برای تعیین روابط فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج وجود چندین نواحی حفاظت‌شده بین توالی‌های انتخابی را نشان داد (شکل ۱) که این نواحی برای عملکرد ژن در گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. یکی از این نواحی حفاظت‌شده مربوط به قطعه K است که دارای ۱۵ اسیدآمینه غنی از لایزین می‌باشد. هنگامی که تنش پسابی (Dehydration) اتفاق می‌افتد، این موتیف باعث ایجاد یک آلفا-هلیکس در پروتئین می‌شود که شباهت بسیاری به آلفا-هلیکس موجود در قسمت A2 آپولپو پروتئین دارد و نقش آن واکنش با پروتئین‌هایی است که تحت تنش پسابی قرار گرفته‌اند و این پروتئین



شکل ۱. قسمت‌های حفاظت‌شده در توالی‌های دهیدرین گیاهان موردبررسی
Figure 1. Preserved segments of dehydrin protein sequences in evaluated plant species

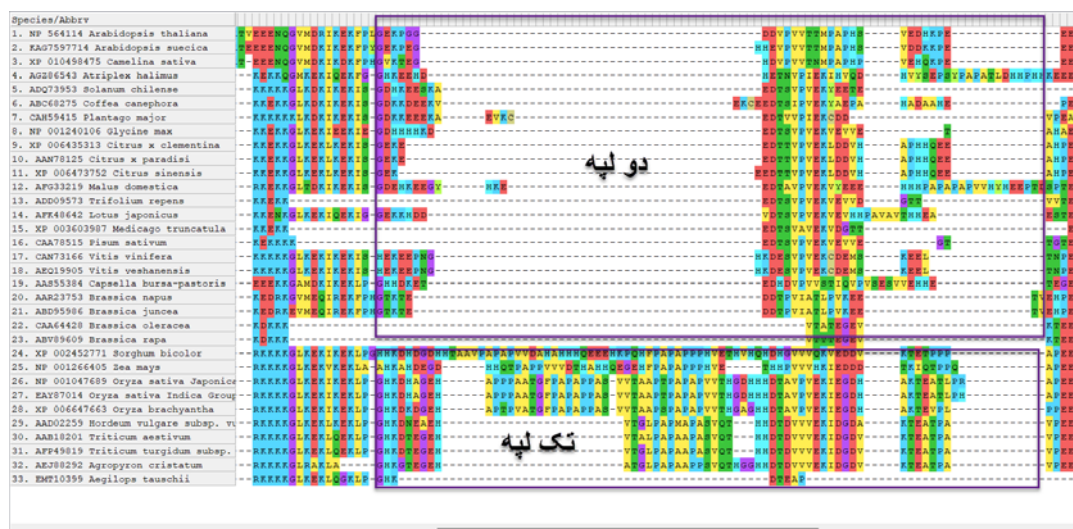


شکل ۲. قسمت‌های محافظت‌شده S و K جهت مقایسه آن‌ها
Figure 2. Preserved K and S segments of dehydrin protein sequences



شکل ۳. درخت فیلوژنی مربوط به توالی پروتئین‌های گروه دهیدرین بر پایه روش Neighbor Joining در نرم‌افزار MEGA11

Figure 3. Phylogenetic tree of dehydrin proteins based on Neighbor Joining method using Mega 11 software



شکل ۴. بخش‌های متفاوت در توالی مربوط به گروه پروتئین خانواده دهیدرین بین گیاهان تک‌لپه و دو‌لپه

Figure 4. Unpreserved segments of dehydrin protein family regarding monocotyledon and dicotyledon plants

تبدیل به یک گراف با ساختار ساده گردید (شکل ۵). در این شکل مشاهده می‌گردد که به‌صورت کلی گیاهان مورد بررسی دارای شباهت‌های ساختاری قابل مشاهده هستند، با این حال در این شکل مجزا بودن دو گروه دو‌لپه و تک‌لپه بر اساس پلات همبستگی رسم شده بر پایه توالی اسیدآمینه‌های پروتئین دهیدرین در گیاهان مختلف محرز و قابل شناسایی است. علاوه بر آن، شکل ۶ که نشان‌دهنده کلاستر بندی گونه‌های گیاهی مورد بررسی در این مطالعه است به‌صورت کاملاً واضح قادر به تفکیک دو گروه گیاهان تک‌لپه و دو‌لپه بود. همچنین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مختلف داخل هر گروه گیاهی و تک‌لپه و دو‌لپه و شباهت ساختاری پروتئین‌های آن‌ها در شکل ۶ قابل تشخیص است.

به‌صورت کلی ۱۹ نوع اسیدآمینه در ساختار پروتئین‌های گیاهی در این مطالعه مشاهده گردید. اسیدآمینه تریپتوفان در هیچ کدام از پروتئین دهیدرین مربوط به گونه‌های گیاهی مورد بررسی مشاهده نگردید. همچنین، اسیدآمینه سیستئین تنها در چهار گونه گیاهی *Coffea canephora* (۱/۸ درصد)، *Plantago major* (۳/۱ درصد)، *Vitis vinifera* (۱/۲ درصد) و *Vitis vishanensis* (۱/۲ درصد) مشاهده گردید (جدول ۱). از بین این چهار گونه گیاهی دو گونه *Coffea canephora* و *Plantago major* با شباهت بالا در داخل یک کلاستر و دو گونه دیگر شامل *Plantago major* و *Vitis vinifera* نیز در یک کلاستر قرار گرفتند (شکل ۶) که نشان‌دهنده شباهت ساختاری این گونه‌های مورد بحث از لحاظ ساختار خطی اسیدآمینه، درصد تشکیل این اسیدآمینه‌ها و همچنین عملکرد آن‌ها است.

در گروه دو‌لپه‌ای‌ها نیز مانند تک‌لپه‌ای‌ها، زیرگروه‌هایی از جنس‌های مختلف *rosacea*, *fabaceae*, *brassicaceae* و *solanaceae* و *plantaginaceae* به وضوح متمایز گردیدند. در این میان یک پروتئین از گونه گیاه سویا از جنس فاباسه تا حدودی دورافتاده و دارای شباهت بیشتری با جنس پلنتاژناسه و سولاناسه بود که نشان‌دهنده شباهت عملکردی این پروتئین در این گیاه با این دو جنس است. جهت مشاهده تفاوت، شباهت و همچنین درصد و نوع اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مورد بررسی و تشخیص کیفی فاصله ژنتیکی گیاهان مختلف در ارتباط با ساختار اسیدآمینه‌های ساختاری این پروتئین‌ها، جدول ۱ که نشان‌دهنده نوع اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مورد بررسی و همچنین درصد تشکیل‌دهنده هر کدام از این اسیدآمینه در توالی و ساختار پروتئینی آورده شده است. به دلیل اینکه این نسبت‌ها قابل درک گردد و معیاری برای مقایسه مناسب‌تر ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مورد بررسی، نتایج و داده‌های موجود در جدول ۱ که شامل نوع و درصد اسیدآمینه‌های ساختاری در این پروتئین‌ها است به ماتریس ناهمسانی ژنتیکی (Genetic Dissimilarity) یا به اصطلاح فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) بین گونه‌ها تبدیل گردید که در جدول ۲ آورده شده است. در این جدول نتایج مقایسه دوه‌دو و جفتی همه گونه‌های گیاهی بر پایه اسیدآمینه‌ها نشان داده شده و می‌توان میزان شباهت یا تفاوت بین همه جفت گونه‌ها را به آسانی با هم مقایسه نمود. نتایج جدول ۲ نیز با استفاده از روش جدید پلات همبستگی

جدول ۱. درصد آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده توالی‌های مربوط به ژن‌های دهیدرین در گیاهان مختلف

Table 1. Ration (Percent) of each amino acid in the linear structure of dehydrin protein of different plant species

گونه گیاهی	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	تعداد جهت باز
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.47	0	5.02	18.92	2.7	5.02	4.25	3.09	16.99	4.63	2.32	1.93	7.34	2.7	1.16	6.56	6.56	6.56	0	0.77	259
<i>Arabidopsis suecica</i>	3.11	0	4.67	19.84	2.33	4.67	5.06	2.33	17.9	5.06	2.33	2.33	7.39	1.95	1.17	7.39	5.84	5.45	0	1.17	257
<i>Camelina sativa</i>	3.92	0	3.92	20	2.75	4.31	5.1	2.75	17.25	4.71	2.35	3.53	7.45	3.14	1.18	5.49	6.67	4.71	0	0.78	255
<i>Atriplex halimus</i>	4.72	0	9.44	15.45	2.58	6.01	7.73	3	17.6	2.58	2.15	2.58	5.15	1.72	1.72	6.44	3	6.01	0	2.15	233
<i>Solanum chilense</i>	5.53	0	5.03	21.11	2.01	7.04	4.02	4.02	18.59	4.02	0.5	1.51	5.53	1.51	1.01	9.05	3.02	5.03	0	1.51	199
<i>Coffea canephora</i>	7.93	1.76	5.73	19.82	1.76	8.81	2.64	3.08	20.26	4.41	0.44	0.88	5.29	1.76	1.32	6.17	2.64	3.96	0	1.32	227
<i>Plantago major</i>	5.68	3.06	5.68	21.4	2.18	4.8	1.75	3.49	18.78	4.37	0.44	0.87	7.42	1.75	0.87	4.8	5.24	5.68	0	1.75	229
<i>Glycine max</i>	4.67	0	5.61	20.09	1.87	7.01	6.54	2.8	17.76	4.67	0.47	0.93	5.14	2.34	1.4	7.48	4.67	5.61	0	0.93	214
<i>Citrus x clementina</i>	5.56	0	5.98	20.09	1.71	5.56	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	6.84	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
<i>Citrus x paradisi</i>	5.13	0	5.98	20.09	1.71	5.56	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	7.26	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
<i>Citrus sinensis</i>	5.13	0	5.98	20.51	1.71	5.13	5.98	2.14	19.23	5.13	0.85	0.43	7.26	3.85	1.28	6.41	3.42	4.7	0	0.85	234
<i>Malus domestica</i>	5.42	0	7.22	20.22	1.44	5.78	6.86	2.53	16.61	3.61	0.36	1.08	6.14	2.17	1.44	7.22	3.61	4.33	0	3.97	277
<i>Trifolium repens</i>	2.76	0	7.37	16.59	1.84	5.07	5.07	3.23	17.05	3.69	0.46	1.84	5.07	1.38	1.38	7.83	11.52	6.45	0	1.38	217
<i>Lotus japonicus</i>	3.86	0	6.87	17.6	2.15	7.73	5.15	3.43	16.31	4.72	0.43	3.86	3.86	3.86	0.43	6.87	6.01	6.44	0	0.43	233
<i>Medicago truncatula</i>	4.78	0	8.61	15.31	1.91	5.26	5.74	2.87	16.75	3.83	0.48	2.87	4.78	1.91	1.44	6.7	11	5.26	0	1.44	209
<i>Pisum sativum</i>	5.09	0	5.56	18.52	1.85	7.41	5.56	2.78	16.2	4.17	0.46	1.39	4.17	0.93	1.39	6.48	11.11	5.56	0	1.39	216
<i>Vitis vinifera</i>	3.61	1.2	6.63	19.28	0.6	5.42	6.63	2.41	20.48	4.82	1.81	1.81	6.63	3.01	0.6	7.83	3.61	3.61	0	0	166
<i>Vitis yeshanensis</i>	3.61	1.2	6.63	19.28	0.6	5.42	6.63	2.41	21.08	4.82	1.81	1.81	6.63	3.01	0	7.83	3.61	3.61	0	0	166
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	3.83	0	4.6	21.07	1.15	4.21	4.6	3.45	14.56	4.21	1.53	2.68	6.51	1.92	1.15	7.66	9.2	7.28	0	0.38	261
<i>Brassica napus</i>	5.17	0	4.43	22.88	2.21	4.43	4.8	1.85	15.87	5.54	1.48	1.48	6.27	1.85	2.58	6.27	7.01	5.17	0	0.74	271
<i>Brassica juncea</i>	4.12	0	4.94	23.05	2.06	4.12	4.53	2.06	18.11	5.76	1.65	0.82	5.35	2.47	2.06	6.17	7.41	4.94	0	0.41	243
<i>Brassica oleracea</i>	5.03	0	6.03	20.6	2.01	5.53	5.03	2.01	19.1	4.52	1.01	0.5	6.53	0.5	1.51	7.54	5.53	6.53	0	0.5	199
<i>Brassica rapa</i>	3.65	0	5.73	20.83	2.08	5.73	5.21	2.08	18.23	4.69	1.04	0.52	6.77	0.52	1.04	7.29	6.77	7.29	0	0.52	192
<i>Sorghum bicolor</i>	9.89	0	7.07	14.84	0.35	7.07	9.19	2.12	13.78	5.3	1.06	0.71	8.13	3.53	1.77	5.65	2.83	6.36	0	0.35	283
<i>Zea mays</i>	9.96	0	8.54	12.81	0.36	7.12	7.83	2.49	12.46	5.34	1.07	1.78	8.19	4.63	2.14	5.69	3.56	5.69	0	0.36	281
<i>Oryza sativa Japonica</i>	11.38	0	5.52	14.48	1.03	7.93	5.86	2.07	13.1	4.83	1.03	1.03	10.69	1.03	2.07	6.9	5.17	5.52	0	0.34	290
<i>Oryza sativa Indica</i>	11.64	0	5.48	14.38	1.03	7.88	6.16	2.05	13.01	4.79	1.03	1.03	10.62	1.03	1.71	7.19	5.14	5.48	0	0.34	292
<i>Oryza brachyantha</i>	10.45	0	5.57	14.29	1.05	8.36	4.53	2.09	13.94	5.23	1.05	0.7	10.8	1.39	1.39	8.36	4.18	6.27	0	0.35	287
<i>Hordeum vulgare</i>	9.41	0	6.27	16.86	0.78	7.45	3.92	1.96	14.9	6.27	1.57	1.18	7.06	1.57	1.96	6.67	4.31	7.06	0	0.78	255
<i>Triticum aestivum</i>	10.82	0	5.97	16.04	0.75	7.46	4.48	1.87	14.18	5.97	1.12	0.75	7.09	1.87	1.49	6.34	5.22	7.84	0	0.75	268
<i>Triticum turgidum</i>	10.45	0	5.97	16.04	0.75	7.84	4.48	1.87	14.18	5.97	1.12	0.75	7.09	1.87	1.49	6.34	5.22	7.84	0	0.75	268
<i>Agropyron cristatum</i>	5.43	0	5.43	17.93	1.09	10.87	3.8	2.17	13.59	5.98	1.63	1.09	4.35	2.72	2.72	7.61	5.43	7.61	0	0.54	184
<i>Aegilops tauschii</i>	7.14	0	6.04	18.68	0.55	8.79	3.3	1.65	15.38	7.14	1.65	1.1	4.95	2.2	2.2	8.79	3.85	5.49	0	1.1	182
میانگین	6.37	0.19	6.03	18.3	1.54	6.39	5.32	2.48	16.49	4.89	1.16	1.38	6.82	2.24	1.47	6.85	5.41	5.76	0	0.91	237

جدول ۲. تخمین ناهمسان (dissimilarity) یا فاصله (distance) ژنتیکی گونه‌های گیاهی بر اساس ترکیب آمینواسیدهای آن‌ها

Table 2. Estimated genetic dissimilarities, or genetic distances, in the structure of dehydrin protein in different plant species based on their amino acid content

گونه گیاهی	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)	0.0																							
<i>Arabidopsis suecica</i> (2)	0	0.0																						
<i>Camelina sativa</i> (3)	0	0	0.0																					
<i>Atriplex halimus</i> (4)	0.2	0.6	0.4	0.0																				
<i>Solanum chilense</i> (5)	0	0	0	0.7	0.0																			
<i>Coffea canephora</i> (6)	0.3	0.5	0.5	0.4	0.2	0.0																		
<i>Plantago major</i> (7)	0	0	0	0.4	0.0	0.0	0.0																	
<i>Glycine max</i> (8)	0	0	0	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0																
<i>Citrus x clementina</i> (9)	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0															
<i>Citrus x paradisi</i> (10)	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0														
<i>Citrus sinensis</i> (11)	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0													
<i>Malus domestica</i> (12)	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0												
<i>Trifolium repens</i> (13)	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	1.0	0.5	0.4	0.6	0.5	0.6	0.4	0.4											
<i>Lotus japonicus</i> (14)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.7	0.3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0										
<i>Medicago truncatula</i> (15)	0.0	0.1	0.2	0.0	0.8	1.0	0.4	0.5	0.2	0.2	0.2	0.6	0.0	0.0	0.0									
<i>Pisum sativum</i> (16)	0.0	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.2	0.1	0.3	0.3	0.4	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1								
<i>Vitis vinifera</i> (17)	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0							
<i>Vitis yeshanensis</i> (18)	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0						
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (19)	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
<i>Brassica napus</i> (20)	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
<i>Brassica juncea</i> (21)	0.1	0.0	0.0	0.7	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
<i>Brassica oleracea</i> (22)	0.0	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
<i>Brassica rapa</i> (23)	0.0	0.2	0.2	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Sorghum bicolor</i> (24)	0.6	0.7	0.7	0.2	0.5	0.2	1.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.2	1.0	0.5	0.8	1.0	0.0	0.8	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6
<i>Zea mays</i> (25)	1.0	1.2	1.0	0.4	0.8	0.4	1.7	0.8	0.5	0.6	0.6	0.7	1.1	0.8	0.6	1.1	0.2	0.3	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	0.0

شاخص نابرابری در هر سایت برای همه جفت توالی‌های مورد استفاده نشان داده شده است. مقادیر بیشتر از مقدار عددی صفر (۰) نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در ارتباط با ترکیب پایه آمینواسیدی نسبت به بر اساس واگرایی تکاملی بین توالی‌ها است.

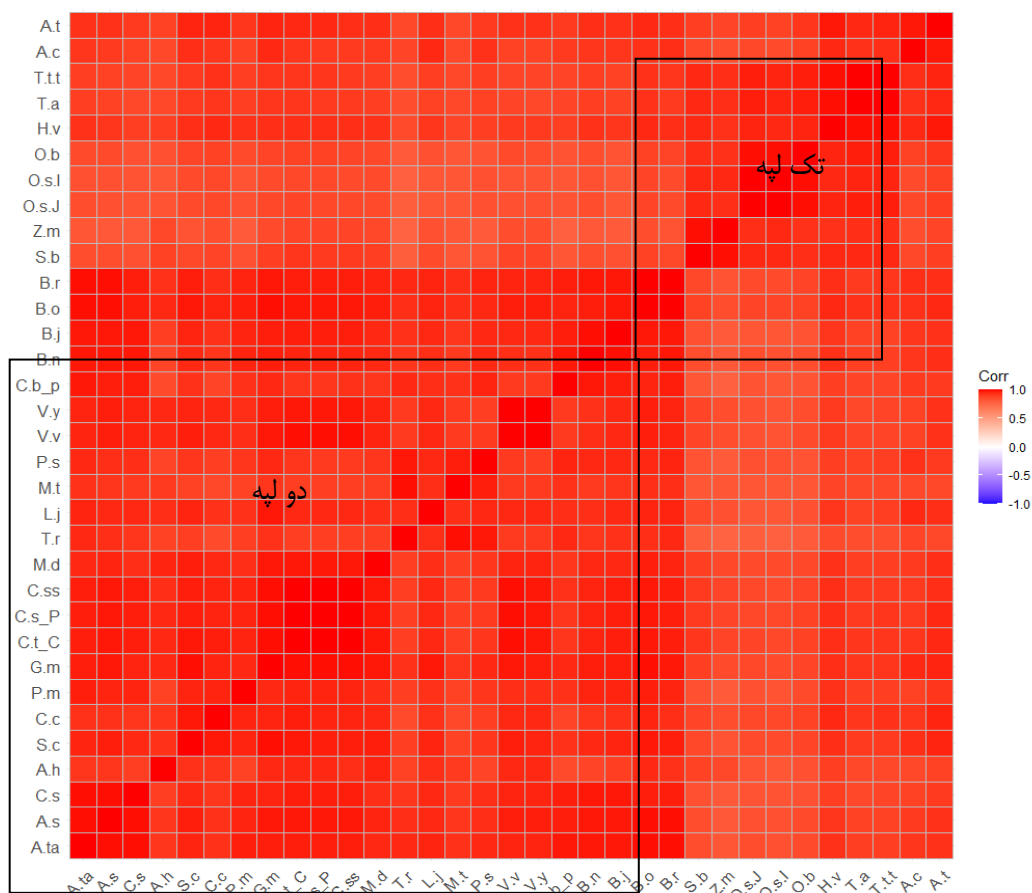
ادامه جدول ۲. تخمین ناهمسان یا فاصله ژنتیکی گونه‌های گیاهی بر اساس ترکیب آمینواسیدهای گروه پروتئین دهیدرین در این گیاهان

Continued table 2. Estimated genetic dissimilarities, or genetic distances, in the structure of dehydrin protein in different plant species based on their amino acid content

گونه گیاهی	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	26	27	28	29	30	31	32
<i>Oryza sativa Japonica</i> (26)	0.18	0.14	0.29	0.17	0.11	0.12	0.81	0.05	0.00	0.03	0.07	0.11	0.56	0.29	0.69	0.40	0.00	0.00	0.44
<i>Oryza sativa Indica</i> (27)	0.24	0.20	0.32	0.15	0.11	0.17	0.84	0.07	0.00	0.03	0.08	0.14	0.56	0.33	0.69	0.40	0.00	0.00	0.49
<i>Oryza brachyantha</i> (28)	0.05	0.05	0.26	0.29	0.05	0.21	0.71	0.11	0.00	0.00	0.00	0.21	0.63	0.27	0.72	0.66	0.00	0.00	0.34
<i>Hordeum vulgare</i> (29)	0.26	0.25	0.38	0.14	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.56	0.14	0.53	0.40	0.00	0.01	0.43
<i>Triticum aestivum</i> (30)	0.35	0.35	0.48	0.17	0.23	0.00	0.70	0.06	0.05	0.08	0.11	0.23	0.58	0.11	0.52	0.40	0.00	0.02	0.44
<i>Triticum turgidum</i> (31)	0.35	0.35	0.48	0.17	0.23	0.00	0.70	0.06	0.05	0.08	0.11	0.23	0.58	0.11	0.52	0.40	0.00	0.02	0.44
<i>Agropyron cristatum</i> (32)	0.00	0.02	0.12	0.15	0.20	0.10	0.42	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.07	0.01	0.00	0.03	0.11	0.10
<i>Aegilops tauschii</i> (33)	0.12	0.04	0.21	0.22	0.00	0.00	0.43	0.03	0.00	0.00	0.00	0.04	0.46	0.02	0.40	0.20	0.01	0.08	0.18

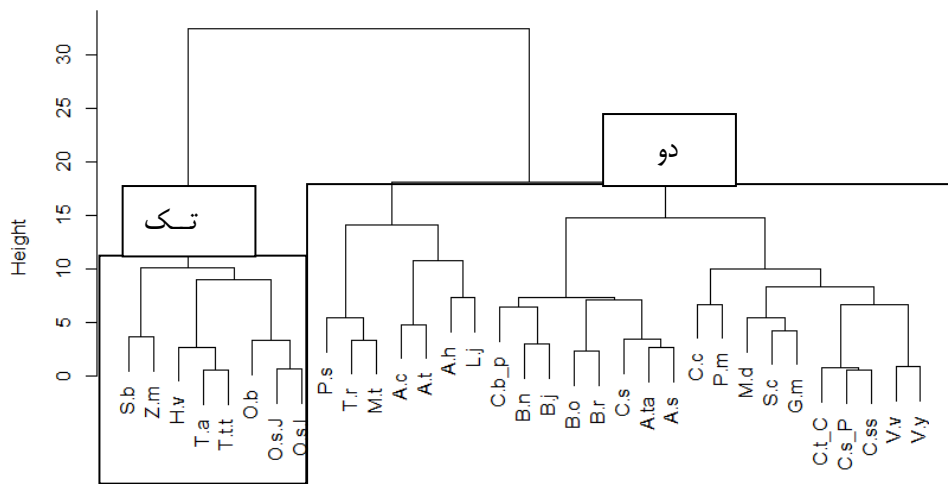
گونه گیاهی	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	31	32
<i>Oryza sativa Japonica</i> (26)	0.15	0.27	0.07	0.08	0.04	0.20							
<i>Oryza sativa Indica</i> (27)	0.17	0.30	0.09	0.08	0.03	0.19	0.00						
<i>Oryza brachyantha</i> (28)	0.15	0.23	0.06	0.09	0.15	0.33	0.02	0.05					
<i>Hordeum vulgare</i> (29)	0.12	0.18	0.03	0.06	0.09	0.24	0.00	0.00	0.00				
<i>Triticum aestivum</i> (30)	0.17	0.26	0.09	0.09	0.04	0.18	0.00	0.00	0.05	0.00			
<i>Triticum turgidum</i> (31)	0.17	0.26	0.09	0.09	0.05	0.20	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00		
<i>Agropyron cristatum</i> (32)	0.01	0.00	0.03	0.00	0.11	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.02	0.01	
<i>Aegilops tauschii</i> (33)	0.00	0.03	0.04	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02

شاخص نابرابری در هر سایت برای همه جفت توالی‌های مورداستفاده نشان داده شده است. مقادیر بیشتر از ۰ نشان دهنده تفاوت ژنتیکی بالا در ارتباط با ترکیب پایه آمینواسیدی نسبت به بر اساس واگرایی تکاملی بین توالی‌ها است.



شکل ۵. پلات همبستگی بین گونه‌های گیاهی مورد بررسی بر اساس ترکیب آمینواسیدی مربوط به توالی پروتئین‌های خاموده دهیدرین

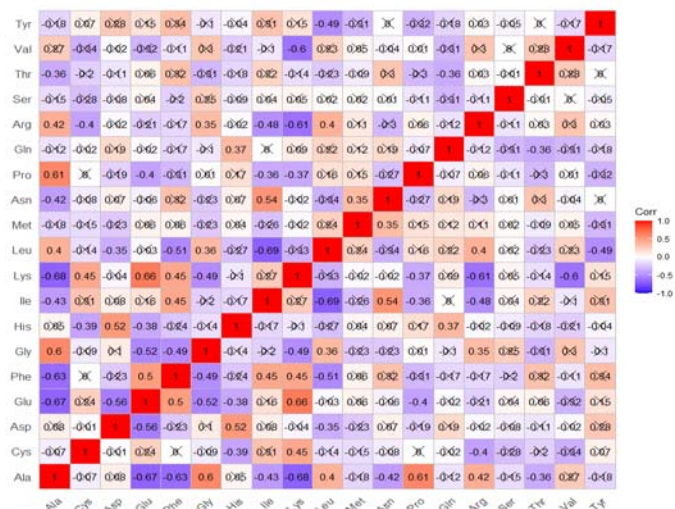
Figure 5. Correlation plot of evaluated plant species based on their amino acid sequences regarding dehydrin proteins



شکل ۶. کلاسترینگ مربوط به گونه‌های گیاهی مورد بررسی بر اساس ترکیب و درصد آمینواسیدی در ارتباط با خانواده پروتئین‌های دهیدرین **Figure 6.** Clustering analysis of the evaluated plant species based on their amino acid sequences regarding dehydrin proteins

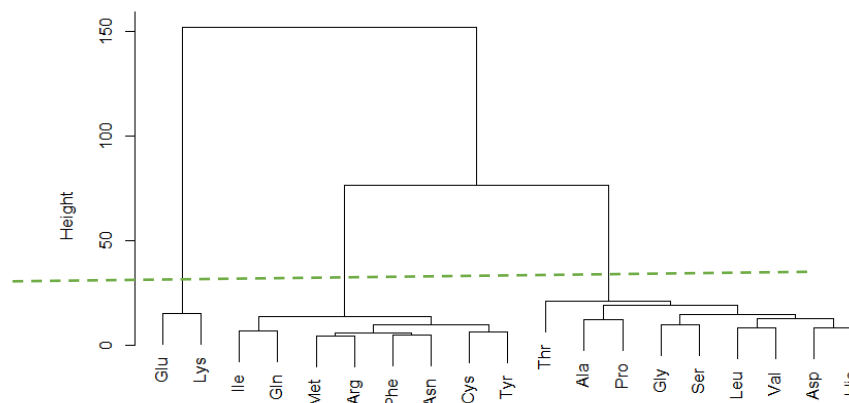
گروه اولی شامل دو اسیدآمینو گلوتامین و لایسین بود، گروه دو شامل ایزولوسین، میتیونین، آرژنین، فنیل‌آلانین، آسپاراژین، سیستئین و فایروزین در گروه دوم و سایر اسیدآمینوهای موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین نیز در گروه سوم قرار گرفتند. بررسی ساختار رابطه‌ای و توزیع اسیدآمینوها در گیاهان مختلف به‌وسیله گراف هیت‌مپ و بای‌پلات در شکل ۹ و شکل ۱۰ آورده شده‌است. در گراف هیت‌مپ، سلول‌های دارای رنگ قرمز تیره با عدد کوچک‌تر از لحاظ علامتی (منفی‌تر) نشان‌دهنده ارتباط پایین تر است و به این معنی است که گیاه موردنظر دارای مقدار پایین تری از آن اسیدآمینو است. سلول‌هایی که دارای عدد بزرگ‌تر و به‌اصطلاح مثبت‌تر هستند نشان‌دهنده ارتباط بالای بین اسیدآمینو موردنظر و گیاه مرتبط با آن سلول است که به معنی بالا بودن مقدار این اسیدآمینو در گیاه مورد بررسی است. این نتایج مرتبط با ارتباط مقابل بین گونه‌های گیاهی و اسیدآمینوهای تشکیل‌دهنده گروه دهیدرین به‌همراه نتایج مربوط به گروه‌بندی گیاهان و خود اسیدآمینوها به‌صورت مجزا به‌وسیله گراف بای‌پلات مورد تایید قرار گرفت (شکل ۹ و ۱۰). در این گراف گیاهان تک‌لپه در یک گوشه از گراف قرار گرفتند و سایر گیاهان دولپه در قسمت‌های دیگر پلات پخش شدند. بیشترین مقدار اسیدهای آمینه در گیاهان تک‌لپه مربوط به اسیدآمینوهای آلانین و گلایسین بود که بیشترین نزدیکی را با این گروه گیاهی داشتند. همچنین، فلش‌های جهت‌دار این گراف که مربوط به هر اسیدآمینو است در صورت نزدیکی به هر گیاه نشان‌دهنده مقدار بالاتر از این اسیدآمینو در گیاه موردنظر است.

بر اساس ترکیب اسیدآمینوهای موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین، مقدار همبستگی بین این پروتئین‌ها محاسبه گردید و با استفاده از نرم‌افزار R به پلات همبستگی تبدیل گردید (شکل ۷). جهت بررسی بیشتر ترکیبات اسیدآمینوهای و مطالعه تفاوت بین این اسیدآمینوها، کلاستر بین آن‌ها ترسیم گردید و که در شکل ۸ ارائه گردیده‌است. اسیدآمینوهای تایروزین، والین، تراونین و سرین با هیچ کدام از اسیدآمینوهای موجود همبستگی معنی‌داری نشان ندادند که نشان‌دهنده تنوع بین گیاهان مورد بررسی در ارتباط با مقدار این اسیدآمینوها در ساختار آن‌هاست. بیشترین مقدار همبستگی از لحاظ عددی بین ۰/۶ و ۰/۷ قرار داشت که بیشترین مقدار آن (۰/۶۹-) در همبستگی بین لوسین و ایزولوسین بود که از لحاظ ساختاری نیز دارای مشابهت بسیار با هم هستند. آلانین با اسیدآمینوهای گلوتامین (۰/۶۷-)، فنیل‌آلانین (۰/۶۳-)، گلایسین (۰/۶-)، ایزولوسین (۰/۴۳-)، لایزین (۰/۶۸-)، لوسین (۰/۴-)، آسپاراژین (۰/۴۲-) و پرولین (۰/۶۱) دارای همبستگی معنی‌دار بود. اسیدآمینو سیستئین با هیستئین (۰/۳۹-)، لایسن (۰/۴۵) و آرژنین (۰/۴-) دارای همبستگی معنی‌دار بود. تنها اسیدآمینو‌هایی که با آسپاراژین همبستگی معنی‌دار نشان دادند اسیدآمینو گلوتامین (۰/۵۶-) و هیستئین (۰/۵۶) بود. اسیدآمینوهای گلوتامین و فنیل‌آلانین دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار (۰/۵) بودند و این دو اسیدآمینو نیز دارای همبستگی منفی معنی‌دار با آلانین، منفی و معنی‌دار با گلایسین و مثبت و معنی‌دار با لایسین بودند. بر اساس شباهت و فاصله اقلیدسی بین اسیدآمینوها موجود در ساختار پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مورد مطالعه، تجزیه کلاستر نشان‌دهنده تفکیک روشن کلیه اسیدآمینوها به سه گروه مجزا بود.



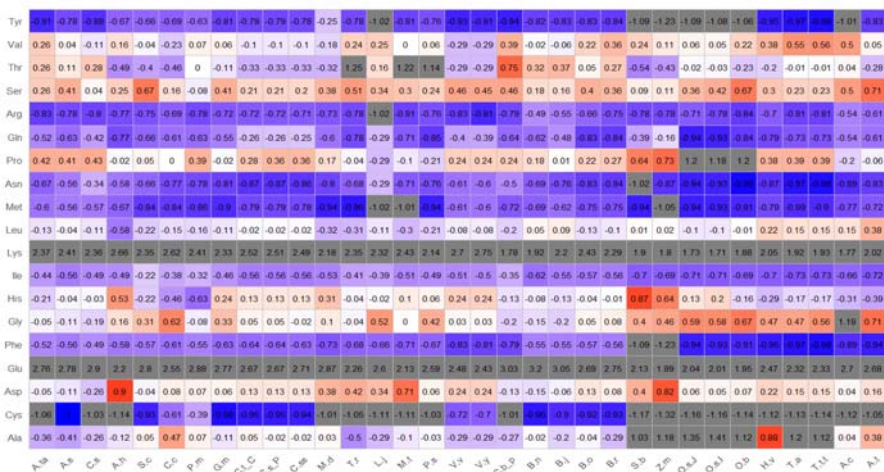
شکل ۷. پلات همبستگی بین آمینواسیدهای موجود در توالی ژنی دهیدرین در گونه‌های مورد بررسی

Figure 7. Correlation plot of the amino acids in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species



شکل ۸. کلاسترینگ مربوط به ترکیبات اسیدآمینو موجود در گونه‌های گیاهی مورد بررسی بر اساس خانواده پروتئین‌های دهیدرین

Figure 8. Clustering of the amino acids in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species



شکل ۹. هیت مپ (Heatmap) مربوط به ترکیبات اسیدآمینو خانواده پروتئین‌های دهیدرین (ردیف‌ها) و گونه‌های گیاهی مورد بررسی (ستون‌ها) جهت

بررسی روابط آنها

Figure 9. Heatmap of the amino acids composition in the protein structure of dehydrin family belonging to the evaluated plant species

و معنی‌دار بین دو گروه گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای بود. از طرفی گیاهان داخل هر یک از این گروه نیز دارای تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی مرتبط با درصد و نحوه قرارگیری اسیدهای آمینه داشتند. اسیدآمینه‌های آلانین، گلیسین و پرولین از جمله اسیدآمینه‌هایی بودند که دارای نزدیکی هندسی در تحلیل مؤلفه‌های اصلی بودند و نشان‌دهنده اهمیت بالای این اسیدآمینه‌ها در ساختار این گیاهان بود. چندین ناحیه حفاظت‌شده در بین پروتئین‌های موردبررسی شناسایی شد که نشان‌دهنده اهمیت این نواحی برای عملکرد ژن‌های دهیدرین است.

داشتند. ۳۹ گونه حاوی حداقل یک دهیدرین YnSKn، ۱۳ گونه حاوی حداقل یک دهیدرین YnKn و ۱۵ گونه حاوی حداقل یک دهیدرین Kn بودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده اهمیت بالای پروتئین‌های خانواده دهیدرین در تحمل شرایط تنش در گیاهان است. بررسی توالی اسیدآمینه‌های ساختاری و درصد آن‌ها به همراه بررسی خطی توالی ژنومی ژن‌های مربوطه نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل‌مشاهده

References

- Borovskii, G. B., Stupnikova, I. V., Antipina, A. I., Vladimirova, S. V., & Voinikov, V. K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology*, 2, 1-7 .
- Decena, M. A., Gálvez-Rojas, S., Agostini, F., Sancho, R., Contreras-Moreira, B., Des Marais, D. L., Hernandez, P., & Catalán, P. (2021). Comparative genomics, evolution, and drought-induced expression of dehydrin genes in model Brachypodium grasses. *Plants*, 10(12), 2664-2681 .
- Koag, M.-C., Wilkens, S., Fenton, R. D., Resnik, J., Vo, E., & Close, T. J. (2009). The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant physiology*, 150(3), 1503-1514 .
- Malik, A. A., Veltri, M., Boddington, K. F., Singh, K. K., & Graether, S. P. (2017). Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. *Frontiers in plant science*, 8, 252-268 .
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 45(2), 237-249 .
- Sun, Y., Liu, L., Sun, S., Han, W., Irfan, M., Zhang, X., Zhang, L., & Chen, L. (2021). AnDHN, a dehydrin protein from *Ammopiptanthus nanus*, mitigates the negative effects of drought stress in plants. *Frontiers in plant science*, 12, 788-838 .
- Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen, Ø. (2012). Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree genetics & genomes*, 8, 957-973 .
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, 148(1), 6-24 .
- Borovskii, G. B., Stupnikova, I. V., Antipina, A. I., Vladimirova, S. V. & Voinikov, V. K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology*, 2, 1-7 .
- Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant molecular biology*, 13, 95-108 .
- Danyluk, J., Houde, M., Rassart, É., & Sarhan, F. (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS letters*, 344(1), 20-24 .
- Decena, M. A., Gálvez-Rojas, S., Agostini, F., Sancho, R., Contreras-Moreira, B., Des Marais, D. L., Hernandez, P., & Catalán, P. (2021). Comparative genomics, evolution, and drought-induced expression of dehydrin genes in model Brachypodium grasses. *Plants*, 10(12), 2664-2681 .
- Farah Yachash, S., Nazeri, S., & Mino Chehar, Z. (2019). In silico investigation of the process of molecular evolution and expansion of the geranyl geranyl diphosphate synthase protein family in plants. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Biology Journal)*, 33(3), 326-342 .
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1503-1509 .
- Jiménez-Bremont, J. F., Maruri-López, I., Ochoa-Alfaro, A. E., Delgado-Sánchez, P., Bravo, J., & Rodríguez-Kessler, M. (2013). LEA gene introns: is the intron of dehydrin genes a characteristic of the serine-segment? *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 128-140 .

- Lan, T., Gao, J., & Zeng, Q.-Y. (2013). Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree genetics & genomes*, 9, 253-264.
- Liu, C.-C., Li, C.-M., Liu, B.-G., Ge, S.-J., Dong, X.-M., Li, W., Zhu, H.-Y., Wang, B.-C., & Yang, C.-P. (2012). Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 848-859 .
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 45(2), 237-249 .
- Sheikh Asadi, M., Naderi, R., Kafi, M., Fatahi Moghadam, M., & Eslami, A. (2019). Study of molecular phylogeny and structure of matk protein in *Lilium ledebourii* [Baker] Boiss. *Journal of plant production research*, 27(4), 181-191 .
- Smith, M. A., & Graether, S. P. (2022). The disordered dehydrin and its role in plant protection: A biochemical perspective. *Biomolecules*, 12(2), 294-307 .
- Stival Sena, J., Giguère, I., Rigault, P., Bousquet, J., & Mackay, J. (2018). Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology*, 38(3), 442-456 .
- Sun, X., Xi, D. H., Feng, H., Du, J. B., Lei, T., Liang, H. G., & Lin, H. H. (2009). The dual effects of salicylic acid on dehydrin accumulation in water-stressed barley seedlings. *Russian journal of plant physiology*, 56, 348-354 .
- Sun, Y., Liu, L., Sun, S., Han, W., Irfan, M., Zhang, X., Zhang, L., & Chen, L. (2021). AnDHN, a dehydrin protein from *Ammopiptanthus nanus*, mitigates the negative effects of drought stress in plants. *Frontiers in plant science*, 12, 788-838 .
- Tripepi, M., Pöhlschroder, M., & Beatrice Bitonti, M. (2011). Diversity of dehydrins in *Oleae europaea* plants exposed to stress. *The Open Plant Science Journal*, 5(1), 308-320 .
- Velasco-Conde, T., Yakovlev, I., Majada, J. P., Aranda, I., & Johnsen, Q. (2012). Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. *Tree genetics & genomes*, 8, 957-973 .
- Verma, G., Dhar, Y. V., Srivastava, D., Kidwai, M., Chauhan, P. S., Bag, S. K., Asif, M. H., & Chakrabarty, D. (2017). Genome-wide analysis of rice dehydrin gene family: Its evolutionary conservedness and expression pattern in response to PEG induced dehydration stress. *PLoS One*, 12(5), 176-193 .
- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S. D., & Wang, Y. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*, 12, 1-17 .
- Yousef Zaei, S., Mahdinjad, N., Fakheri, B., & Ganjali, P. (2019). Identification of DHN5 gene and investigation of its evolutionary relationships in cultivated wheat and its ancestors. *Modern genetics*, 15(4), 361-370 .
- Zan, T., Li, L., Li, J., Zhang, L., & Li, X. (2020). Genome-wide identification and characterization of late embryogenesis abundant protein-encoding gene family in wheat: evolution and expression profiles during development and stress. *Gene*, 736, 1444-1452 .
- Zhang, J., Xia, H., Liang, D., Lin, L., Deng, H., Lv, X., Wang, Z., Wang, J., & Xiong, B. (2021). Genome-wide identification and expression profiling of the dehydrin gene family in *Actinidia chinensis*. *Scientia Horticulturae*, 280, 1099-1130 .

REVIEW ARTICLE

Harnessing machine learning approach for phenotyping and deciphering the plants biotic and abiotic stresses responsive molecular mechanisms

Bahman Panahi^{1*}, Bentolhoda Ghavidel², Poya Shahgoli³

¹Department of Genomics, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

²Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

³Faculty of Information Technology and Computer Engineering, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Correspondence

Bahman Panahi

Email: panahi.lahroodi@gmail.com

How to cite

Panahi, B., Ghavidel, B., & Shahgoli, P. (2024). Harnessing machine learning approach for phenotyping and deciphering the plants biotic and abiotic stresses responsive molecular mechanisms. *Crop Biotechnology*, 13(46), 75-90.

ABSTRACT

Machine learning plays a crucial role in identifying specific stressors that impact plant species and provides a comprehensive understanding of the challenges plants face in natural environments. The use of machine learning algorithms has significantly enhanced our ability to classify and differentiate the types of stress. There are two main methodologies in machine learning: supervised learning and unsupervised learning. In supervised learning, the model is trained using input-output data pairs, while unsupervised learning involves training the model without access to output labels. Unsupervised learning is primarily used for data exploration and dimension reduction. This detailed classification helps us better understand the distinct characteristics associated with different stressors and provides a more nuanced view of the plant stress landscape. Machine learning also enables the quantitative assessment of stress intensity and extent, allowing for an accurate evaluation of its impact on plant health and productivity. This quantitative approach helps researchers measure the true extent of stressors and their effects on the overall health of plant ecosystems. By employing advanced algorithms, machine learning can make predictions about future occurrences of stress and their potential consequences on plant ecosystems. This foresight strengthens preventive measures for sustainable agricultural practices, as researchers and practitioners can anticipate and mitigate potential threats to plant health. The purpose of this review is to provide a comprehensive understanding of the applications and concepts of machine learning in uncovering the complexity of plant stress phenotyping and elucidating the involved molecular mechanisms.

KEYWORDS

Machine Learning, Stress, Biotic, Abiotic, Mechanism, Phenotyping.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله مروری»

بهره‌گیری از یادگیری ماشین در فنوتایپینگ و درک مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاهان

بهمن پناهی^{۱*}، بنت‌الهدی قویدل^۲، پویا شاهگلی^۳

چکیده

یادگیری ماشینی محققان را قادر می‌سازد تا عوامل استرس‌زای خاصی را که بر گونه‌های گیاهی اثر می‌گذارند، مشخص کنند و درک دقیقی از چالش‌های متنوعی که گیاهان در محیط‌های طبیعی با آن مواجه هستند، ارائه کنند. با تشخیص الگوهای ظریف در مجموعه داده‌های گسترده، شناسایی نه‌تنها دقیق، بلکه روشنگر می‌شود و راه را برای مداخلات هدفمند هموار می‌کند. توانایی طبقه‌بندی و تمایز انواع استرس از طریق استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین بهبود یافته است. دو دسته اصلی رویکردهای مبتنی بر یادگیری ماشین شامل یادگیری نظارت شده و یادگیری بدون نظارت می‌باشند. در یادگیری نظارت شده، مدل با داده‌های زوج ورودی-خروجی آموزش داده می‌شود ولی در یادگیری بدون نظارت، مدل بدون دسترسی به برچسب‌های ورودی آموزش داده می‌شود و عمدتاً برای کاوش داده‌ها و کاهش ابعاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. این طبقه‌بندی ظریف به درک کلی از ویژگی‌های متمایز مرتبط با عوامل استرس‌زای مختلف کمک می‌کند و نمای ظریف‌تری از چشم‌انداز تنش گیاه ارائه می‌دهد. یادگیری ماشینی ارزیابی کمی از شدت و میزان استرس را تسهیل می‌کند و امکان ارزیابی دقیق تأثیر بر سلامت و بهره‌وری گیاه را فراهم می‌کند. این رویکرد کمی محققان را قادر می‌سازد تا میزان واقعی عوامل استرس‌زا و پیامدهای آن‌ها را بر سلامت کلی اکوسیستم گیاهی بسنجند. با استفاده از الگوریتم‌های پیشرفته، پیش‌بینی‌هایی در مورد وقوع استرس در آینده و پیامدهای بالقوه آن‌ها بر اکوسیستم‌های گیاهی می‌توان انجام داد. این آینده‌نگاری اقدامات پیشگیرانه را برای شیوه‌های کشاورزی پایدار تقویت می‌کند، زیرا محققان می‌توانند تهدیدهای بالقوه برای سلامت گیاهان را پیش‌بینی کرده و کاهش دهند. هدف این بررسی ارائه یک درک جامع از کاربردها و مفاهیم یادگیری ماشینی در کشف اسرار فنوتیپ استرس گیاهی و تشریح مکانیسم مولکولی دخیل است.

واژه‌های کلیدی

یادگیری ماشین، تنش، زیستی، غیر زیستی، مکانیسم، فنوتایپینگ.

^۱گروه ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران.
^۲گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران.
^۳دانشکده فناوری اطلاعات و مهندسی کامپیوتر دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

نویسنده مسئول:

بهمن پناهی

رایانامه: panahi.lahroodi@gmail.com

استناد به این مقاله:

پناهی، بهمن؛ قویدل، بنت‌الهدی و شاهگلی، پویا (۱۴۰۳). کاربرد یادگیری ماشین در فنوتایپینگ و درک مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاهان. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۶)، ۷۵-۹۰.

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

برای پاسخ به تقاضای آینده برای غذا، فیبر و سوخت، تولید محصولات کشاورزی باید تا سال ۲۰۵۰ دو برابر شود. عملکرد محصولات اساساً توسط تنش‌های گیاهی (زیستی و غیرزیستی) محدود می‌شود و اصلاح‌کنندگان گیاهی با ترکیب ژن‌های مقاومت و توسعه ارقام مقاوم به تغییرات اقلیمی، به بهبود عملکرد گیاهان در برابر تنش کمک می‌کنند. اصلاح‌کنندگان و محققان گیاهی، بر فنوتیپ گیاهی برای جمع‌آوری دقیق صفات و استفاده از ابزارهای ژنتیکی برای دستیابی به اهداف تحقیقاتی خود تکیه می‌کنند. فنوتایپینگ گیاهی به کاربرد روش‌ها و پروتکل‌ها برای اندازه‌گیری صفت خاص مرتبط با ساختار و عملکرد گیاه، از سطح سلولی تا کل گیاه یا سطح پوشش گیاه (canopy)، اطلاق می‌شود (Meraj *et al.*, 2024). در حال حاضر جمع‌آوری داده‌های فنوتیپی در مقیاس میکروسکوپی یک فرآیند دستی بوده که متخصصان را برای اندازه‌گیری فنوتیپ‌های مختلف درگیر می‌کند (van Dijk *et al.*, 2021). به منظور پیشرفت علم گیاهی، فنوتیپ دیجیتال گیاهی با هدف استخراج خودکار فنوتیپ‌ها از داده‌های حسگر به یک زمینه تحقیقاتی فعال تبدیل شده است (Kaiser *et al.*, 2024). در این زمینه یادگیری ماشین به‌عنوان رویکرد بین‌رشته‌ای بوده که از نظریه احتمال، آمار، تئوری تصمیم، تجسم و بهینه‌سازی برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده می‌کند. رویکردهای یادگیری ماشین معمولاً در موقعیت‌هایی مفید هستند که مقادیر زیادی از داده‌ها در دسترس هستند و ورودی‌ها (به‌عنوان مثال، داده‌های تصویر) را به مقادیر خروجی مورد علاقه (مثلاً فنوتیپ‌های استرس) مرتبط می‌کنند (Meraj *et al.*, 2024).

ظهور فناوری‌های توالی‌یابی سرتاسری و اطلاعات حاصل از آن، زیست‌شناسان را قادر می‌سازد تا به بررسی موضوعاتی بپردازند که زمانی بررسی آن‌ها دشوار یا غیرممکن بود. با این وجود داده‌های حاصل به دلیل خطاهای اندازه‌گیری و خطاهای ناشی از داده‌های ورودی قطعیت بالایی ندارند. لذا پردازش و تحلیل چنین مجموعه داده‌های بزرگی با استفاده از روش‌های آماری سنتی غیرممکن بوده و نیاز به رویکردهای یادگیری مدرن دارد (Panahi *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020).

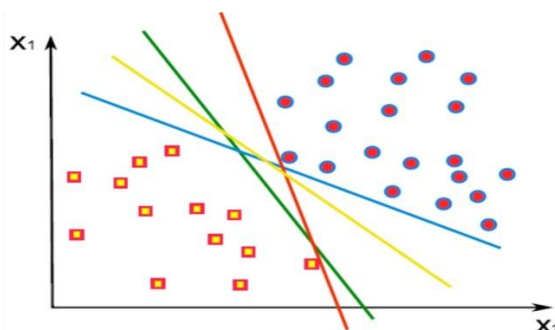
یادگیری ماشین علم برنامه‌نویسی جهت دریافت و شناخت الگوها و استخراج نتایج جدید از داده‌ها هست. این علم به‌طور گسترده در مطالعات اصلاح گیاهی و برای تفسیر داده‌های حاصل

از توالی‌یابی جهت مطالعه فنوتیپ گیاهان استفاده می‌شود (Niazian & Niedbala, 2020).

این رویکرد همچنین در زمینه‌های مرتبط با شناسایی تنش در گیاهان سودمند هست چراکه می‌تواند الگوها را با استفاده از ترکیب هم‌زمان عوامل متعدد به‌جای بررسی جداگانه صفات، تشخیص دهد. مفاهیم یادگیری ماشین (ML) در چهار دسته کلی در بررسی فنوتیپ تنش گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دسته‌بندی‌ها را به‌اصطلاح "ICQP" می‌گویند که مخفف (i) شناسایی، (ii) طبقه‌بندی، (iii) کمی‌سازی، و (iv) پیش‌بینی است. این چهار دسته شامل زنجیره‌ای از ویژگی‌ها هست که در آن اطلاعات به‌طور فزاینده‌ای از یک تصویر مشخص استنتاج می‌شود. شناسایی به تشخیص تنش خاص مانند سندرم مرگ ناگهانی سویا یا زنگ گندم اشاره دارد. طبقه‌بندی مرحله بعدی است، جایی که یادگیری ماشین برای طبقه‌بندی تصویر بر اساس علائم تنش و نشانه‌ها استفاده می‌شود (Anim-Ayeko *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2023). کمی‌سازی شامل توصیف کمی تنش از نظر بروز و شدت است. بروز بیماری به‌عنوان میزان رخ داد جدید بیماری در یک دوره زمانی یا در هر لحظه (معمولاً در زمان حداکثر بروز بیماری) تعریف می‌شود. در آسیب‌شناسی گیاهی، یک روش رایج برای توصیف بروز بیماری، درصد برگ‌های بیمار روی یک گیاه یا تعداد گیاهان بیمار از کل تعداد گیاهان در یک مزرعه یا قطعه است (Das Choudhury *et al.*). شدت بیماری یک معیار کمی دقیق‌تر است و به‌عنوان ناحیه بافت گیاهی تحت تأثیر بیماری (معمولاً به‌صورت درصد نشان داده می‌شود) روی یک برگ یا کل تاج پوشش گیاه گزارش می‌شود (Bock *et al.*, 2010). آخرین دسته، پیش‌بینی تنش گیاهی قبل از ظاهر شدن علائم تنش قابل مشاهده است که جهت کنترل به‌موقع و مقرون به‌صرفه تنش نقش مؤثری دارد (Gou *et al.*, 2024; Sarkar *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2018).

در مقاله مروری حاضر الگوریتم‌های مختلف یادگیری ماشین و نیز کاربردهای آن‌ها در ارتباط با فنوتایپینگ و درک مکانیسم‌های مرتبط با تنش‌های گیاهی مورد بررسی و بحث قرار می‌گیرد.

قرار می‌گیرند (Panahi *et al.*, 2019). آن‌ها با موفقیت در بسیاری از مطالعات مربوط به تشخیص تنش گیاهی، مانند شناسایی بیماری Huanglongbing (HLB) که با عنوان بیماری سبز شدن مرکبات شناخته می‌شود) و تنش‌های ناشی از کمبود مواد مغذی در برگ‌های مرکبات استفاده شده‌اند (Cen *et al.*, 2017). در عین حال که SVM ساده بوده و با ابعاد بالای داده‌ها (از جمله طیف‌ها و تصاویر) کاملاً خوب کار می‌کند، اما نمی‌تواند میزان تأثیر خطاها بر شناسایی کلاس واقعی را توضیح دهد. این امر به ویژه زمانی مشکل‌ساز است که مجموعه داده‌ها دارای داده‌های پرت بوده و تعریف یک مرز تصمیم‌گیری مشخص مشکل باشد (Sadeghi *et al.*, 2021; Ghahramani *et al.*, 2022; Tahmasebi *et al.*, 2023; Zubler & Yoon, 2020). همچنین ماشین بردار پشتیبان (SVM) برای تشخیص زودرس بیماری برگ قرمز بادام (*Prunus dulcis*) با استفاده از تصاویر هایپراسپکترال با وضوح بالا و تصاویر حرارتی استفاده شد. نتایج نشان داد که روش به کار رفته به صورت موثری توانایی تفکیک درختان سالم و بیمار را دارد (Peña *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای دیگر روش طبقه‌بندی SVM برای شناسایی بیماری verticillium wilt در زیتون (*Olea europaea*) با استفاده از تصاویر حرارتی و هایپراسپکترال استفاده شد نتایج نشان داد که این روش با دقت طبقه بندی ۷۹٫۲٪ می‌تواند درختان آلوده به قارچ مذکور را از نمونه‌های سالم تشخیص دهد (Calderón *et al.*, 2015).



شکل ۱. یک مرز تصمیم برای داده‌های دو بعدی (Cervantes *et al.*, 2020).

شناسایی زودهنگام بیماری Huanglongbing (HLB) روش کارآمدی برای کنترل گسترش این بیماری به شمار می‌رود. یادگیری ماشین برای شناسایی و تخمین HLB بر اساس داده‌های طیف‌سنجی تصویربرداری فلورسانس نمونه‌های برگ

۱-۲- استفاده از یادگیری ماشین در فنوتایپینگ تنش‌های گیاهی

الگوریتم‌های یادگیری ماشین برای دسته‌بندی داده‌های فنوتایپ گیاهی استفاده می‌شود. بر اساس مطالعات صورت گرفته، برای دسته‌بندی تنش‌های زنده، عمدتاً از الگوریتم‌های یادگیری ماشین مانند درخت تصمیم، ماشین بردار پشتیبان (SVM)، و شبکه‌های عصبی استفاده می‌کنند تا با استفاده از ویژگی‌های مختلف مانند مورفولوژی گیاه، میزان رشد، و ویژگی‌های بیوشیمیایی، می‌تواند تنش‌های زنده را شناسایی و دسته‌بندی کرد. تنش‌های غیرزنده که شامل عوامل محیطی مانند خشکسالی، شوری خاک، دما، و نور می‌باشند. برای دسته‌بندی تنش‌های غیرزنده، نیاز به تحلیل داده‌های محیطی و آماری داریم. الگوریتم‌های مبتنی بر رگرسیون خطی، مدل‌های مارکوف، و روش‌های مبتنی بر تشخیص الگو می‌توانند عمدتاً برای تفکیک و دسته‌بندی تنش‌های غیرزنده مفید می‌باشند (Singh *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2022). با استفاده از داده‌های جمع‌آوری شده میدانی، آزمایشگاهی، و حسگرهای مختلف، می‌توان الگوها و روندهای فعالیت گیاهان را در مقابل تنش‌های زنده و غیرزنده دسته‌بندی کرد. این دسته‌بندی‌ها می‌تواند به محققان و کشاورزان کمک کند تا بهترین راهکارها برای مدیریت تنش‌های گیاهی را پیدا کنند (Shoab *et al.*, 2023).

۱-۲-۱- ماشین بردار پشتیبان

ماشین بردار پشتیبان (SVM) روش یادگیری نظارت‌شده بوده که می‌تواند داده‌ها را بر روی یک سیستم مختصات دوبعدی با کلاس‌های شناخته شده (تنش در مقابل سالم) به صورت خطی رسم کرده و به بهترین وجه داده‌ها را به دو کلاس تقسیم کند. به خط تقسیم کننده دو کلاس اصطلاحاً خط مرز تصمیم گفته می‌شود (شکل ۱) (Cervantes *et al.*, 2020). این روش همچنین می‌تواند برای داده‌های با سه بعد یا ابعاد بیشتر نیز استفاده شود. در حالی که SVM ذاتاً یک روش خطی است، جداسازی غیرخطی نیز با استفاده از هسته‌های غیرخطی امکان‌پذیر است. طبقه‌بندی به چند کلاس نیز با استفاده از مرزهای تصمیم‌گیری چندگانه امکان‌پذیر است (Zubler & Yoon, 2020). SVM ها یکی از رایج‌ترین الگوریتم‌های یادگیری ماشینی هستند که در برنامه‌های کشاورزی مورد استفاده

گزارشات صورت گرفته، این الگوریتم می‌تواند ژنوتیپ‌های ذرت را با دقت ۸۵ درصد از همدیگر تشخیص دهد (Seka et al., 2019). همسوس با طیف متنوع کارکرد رویکردهای یادگیری ماشین، این الگوریتم همچنین برای ارزیابی میزان و شدت بیمار در ریشه گیاهان به کار رفته است. این رویکرد که در نرم افزاری با عنوان PlantCV ارائه شده است، می‌تواند به کمک تصاویر فراقمرز، ریشه‌های آلوده را از ریشه‌های سالم گیاهان زراعی تشخیص دهد. عملکرد این روش می‌تواند تاثیر بسزایی در کنترل بیماری‌های خاکزاد در گیاهان داشته باشد (Pierz et al., 2023). اخیراً، همچنین با استفاده از الگوریتم naïve bayes برای تشخیص گونه‌های گندم مورد استفاده قرار گرفته است (Arora et al., 2023). علاوه بر موارد مذکور کارکرد و توانایی الگوریتم naïve bayes در تشخیص ارقام گردوی مقاوم به سرمای دیررس بهاره (Panahi et al., 2022) و نیز تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف انگور (Holasou et al., 2024) مورد تاکید قرار گرفته است.

۳-۲-۱-K-mean

K-mean محبوب‌ترین روش طبقه‌بندی خوشه‌بندی است که اولین بار در سال توسط MacQueen در سال ۱۹۶۷ پیشنهاد شد. K-mean روش خوشه‌بندی تکراری بدون نظارت، غیرقطعی و عددی است. در K-mean هر خوشه با مقدار میانگین اشیا در خوشه نشان داده می‌شود (Yadav & Sharma, 2013). این روش خوشه‌بندی نوعی یادگیری بدون نظارت است که بر روی داده‌های بدون برچسب اعمال می‌شود. هدف این الگوریتم شناسایی گروه‌های غیرهمپوشانی معینی در داده‌ها است و K متغیری است که تعداد گروه‌ها را نشان می‌دهد. الگوریتم به صورت تکراری کار می‌کند و و هر نقطه داده را به یکی از گروه‌های K اختصاص می‌دهد. بر اساس شباهت ویژگی داده‌ها، نقاط خوشه‌بندی می‌شوند (Paul et al., 2020).

هدف از خوشه‌بندی، گروه‌بندی نمونه‌ها به بخش‌هایی است که دارای ویژگی‌های مشابه بر اساس برخی معیارهای فاصله یا تشابه هستند. الگوریتم‌های مبتنی بر مرکز مانند K-means، یکی از متداول‌ترین الگوریتم‌های خوشه‌بندی است. مرکز K به‌عنوان مرکز خوشه‌های متناظر که دارای حداقل فاصله با نمونه‌های دیگر در همان خوشه‌ها هستند، در نظر گرفته می‌شود (Sun et al., 2020). این رویکرد به صورت موفقی برای

استفاده شده است (Wetterich et al., 2013). تصاویر پیش‌پردازش شده (بخش بندی شده) و ویژگی‌های استخراج شده به‌عنوان ورودی SVM مورد استفاده قرار گرفتند (Singh et al., 2016). در پیش‌بینی بیماری بلاست برنج نیز SVM به‌عنوان یک مدل با استفاده از داده‌های مبتنی بر آب و هوا استفاده شده است (Kaundal et al., 2006). در پیش‌بینی بیماری سیب‌زمینی با استفاده از تصاویر برگ‌های سیب‌زمینی و ویژگی‌هایی که در این تصاویر مانند ویژگی‌های طیفی و زمینه‌ای وجود دارد با استفاده از الگوریتم SVM طبقه‌بندی می‌شود (Islam et al., 2017). از این رویکرد در تلفیق با تصاویر مادون قرمز برای شناسایی مناطقی از مزارع اسفناج که دچار تنش کم آبی شدند، استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که الگوریتم SVM می‌تواند این نواحی را با دقت بالایی (۹۶ درصد) از نواحی دیگر که دچار خشکی نشده‌اند، تشخیص دهد (Raza et al., 2014). در مطالعه دیگری، SVM برای شناسایی تنش خشکی در گیاهان جو (*Hordeum vulgare*) با استفاده از مجموعه تصاویر هایپراسپکترال مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه دقت تشخیص چهار روش پیش‌بینی نظارت شده شامل ماشین بردار پشتیبان (SVM)، one-vs.-all SVM، رگرسیون ماشین بردار پشتیبان (SVR)، رگرسیون ترتیبی ماشین بردار پشتیبان (SVORIM) برای استخراج سطوح استرس در جو مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی‌ها و نتایج بدست آمده نشان داد که رویکرد one-vs.-all SVM نسبت به روش‌های دیگر تنش خشکی را با دقت بالاتری (۸۳ درصد)

۲-۲-۱-Naïve Bayes

Naïve Bayes با فرض استقلال ویژگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این الگوریتم یک روش محبوب برای طبقه‌بندی متن می‌باشد (Naik et al., 2017b). مشخص شده است که الگوریتم naïve bayes می‌تواند بیماری میوه پایا را با دقت ۹۰٪ را تشخیص دهد، در این روش ابتدا تصاویر برگ این میوه را که شامل ۴۱ ویژگی هست و همچنین روی برگ‌هایی که دارای ۱۳ نوع بیماری می‌باشند استفاده شده است (Panahi et al., 2020; Sari et al., 2020). همچنین این رویکرد به صورت موفقی برای ارزیابی شدت تنش در سویا مورد استفاده قرار گرفته است (Naik et al., 2017a). در مطالعه‌ای دیگر از این رویکرد برای تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف ذرت استفاده شد. بر اساس

طریق یک یا چند لایه پنهان بعدی پردازش شده و در نهایت به لایه خروجی پیوند داده می‌شود. شبکه‌های عصبی در این زمینه از تکنیک‌های پیشرفته مانند طبقه‌بندی تصاویر، شیمی محاسباتی و فیزیک بهتر عمل کرده‌اند. در ژنومیک، برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن، درک پروموتورها (promoters) و افزایش‌دهنده‌ها (enhancers) و شناسایی مکان‌های شروع ترجمه کاربرد دارد (Sun et al., 2020). در شبکه‌های عصبی مصنوعی، رویکردهای عمیق دارای لایه‌های پنهان بسیار بیشتری در شبکه هستند و از این رو قدرت تشخیص و پیش‌بینی بیشتری دارند (Pound et al., 2017). این روش یک مدل نظری است که رابطه بین سیگنال‌های ورودی و خروجی برگرفته از شبکه‌های عصبی بیولوژیکی را نشان می‌دهد (Paul et al., 2020).

در کشاورزی برای کاربردهای متعدد، مانند مدل‌سازی اطلاعات حرارتی برای ارزیابی تنش آب، نقشه برداری پوشش گیاهی، پیش‌بینی عملکرد و پیش‌بینی تنش نیتروژن کاربرد دارد. (Virnodkar et al., 2020). برای تشخیص بیماری گیاهان با استفاده از تصویر گیاهان که از شبکه عصبی مصنوعی و SVM و با استفاده از کاهش ویژگی‌ها اعم از کاهش رنگ که می‌تواند موجب افزایش سرعت الگوریتم شود استفاده شده است که دقت بسیار مناسب ۹۲٪ نیز را به دست آورده است (Pujari et al., 2016).

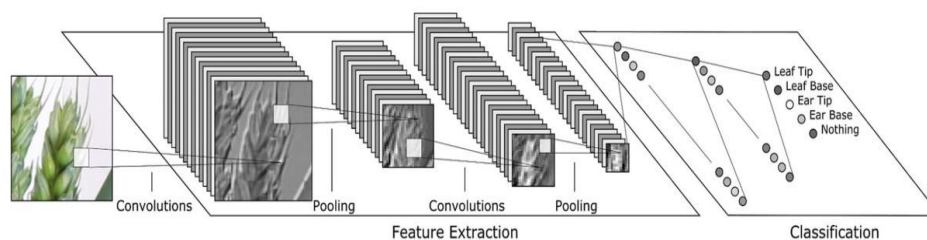
۱-۲-۴-۱- شبکه‌های عصبی پیچشی (CNN)

در شبکه‌های عصبی CNN نقشه‌های ویژگی‌های ممکن است شامل آرایش‌های پیچیده از ویژگی‌هایی باشد که اشیاء دنیای واقعی را نشان می‌دهند. توجه به این نکته ضروری است که این ویژگی‌ها الگوریتم‌های آموزشی CNN هستند و به صورت دستی کدگذاری نمی‌شوند. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، CNN‌های مدرن معمولاً از لایه‌های زیادی استفاده می‌کند که شبکه‌ها را پیچیده می‌کند و اغلب به صدها و گاهی هزاران تصویر برای آموزش با دقت مطلوب نیاز دارد (Pound et al., 2017).

گروه‌بندی گیاهان آلوده به بیماری و نیز سالم با استفاده از تصاویر برگ مورد استفاده قرار گرفته است (Trivedi et al., 2022). همچنین کارکرد موفق این الگوریتم در ارزیابی ژنوتیپ‌های مختلف سویا در شرایط گلخانه گزارش شده است (Zhou et al., 2018). پیش‌بینی عملکرد برداشت، روش‌های مزرعه را قادر می‌سازد تا در طول فصل رشد اصلاح شوند. سنجش از دور مبتنی بر وسایل نقلیه هوایی بدون سرنشین (UAV) روشی امیدوارکننده برای تخمین عملکرد محصول است. در یک مطالعه، عملکرد برنج با تقسیم‌بندی مناطق دانه با استفاده از تصاویر RGB در ارتفاع پایین جمع‌آوری شده با استفاده از پهپاد نوع بال چرخشی برآورد شد. در این مطالعه، یک روش پردازش تصویر که ترکیبی از خوشه‌بندی K-means با یک الگوریتم برش نمودار (KCG) برای بخش‌بندی مناطق دانه برنج ارائه گردیده است. تصاویر RGB پیش‌زمینه به فضای رنگی Lab تبدیل و سپس از خوشه‌بندی K-means برای برجسب گذاری پیکسل‌ها بر اساس اطلاعات رنگ استفاده گردیده است. نتایج نشان داد که روش پیشنهادی می‌تواند نواحی دانه‌ها را با خطای نسبی ۶٪ تا ۳۳٪ تقسیم‌بندی کند و خطای نسبی روش قبلی را (۱٪ تا ۳۱٪) بهبود بخشد (Reza et al., 2019). عملکرد گندم تحت تأثیر تعداد خوشه در واحد سطح است و به طور سنتی از شمارش دستی برای تخمین عملکرد گندم استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای، برای تحقق شمارش سریع و دقیق بلال گندم، از خوشه‌بندی K-means برای تقسیم خودکار تصاویر خوشه گندم گرفته شده توسط دستگاه‌های دستی استفاده شد. مجموعه داده‌های بخش بندی شده با ایجاد چهار دسته برجسب تصویر ساخته شد: بلال غیر گندم، یک خوشه گندم، دو خوشه گندم، و سه خوشه گندم، که سپس برای آموزش و آزمایش به مدل شبکه عصبی کانولوشن (CNN) ارسال شد. رویکرد به کار رفته توانست خوشه‌های گندم را با دقت بالا و قابل قبول دسته بندی و تعداد آنها را ارائه دهد (Xu et al., 2020).

۱-۲-۴-۱- شبکه‌های عصبی

شبکه عصبی (Neural network)، ساختار عصبی مغز انسان را با گره‌های به هم پیوسته که در لایه‌های مختلف سازماندهی شده است تقلید می‌کند. داده‌های آموزشی (Training data) ابتدا وارد لایه ورودی می‌شوند، سپس از



شکل ۲. یک مثال ساده از CNN که بر روی تصویر بخشی از خوشه گندم کار می‌کند. هر لایه به‌طور خودکار ویژگی‌های مفید مانند لبه‌ها یا گوشه‌ها را استخراج می‌کند و تعدادی نقشه ویژگی را خروجی می‌دهد. عملیات ادغام اندازه نقشه‌های ویژگی را برای بهبود کارایی کوچک می‌کند. تعداد نقشه‌های ویژگی عمیق‌تر در شبکه افزایش می‌یابد تا دقت طبقه‌بندی بهبود یابد. در نهایت، لایه‌های شبکه عصبی استاندارد، لایه‌های طبقه‌بندی را تشکیل می‌دهند که خروجی‌های احتمالی را برای هر کلاس ارائه می‌دهند.

نشان می‌دهد که مدل قادر به تشخیص و تمایز بین برگ‌های سالم و برگ‌های بیمار با دقت بالایی است (Shrestha *et al.*, 2020).

۲-۴-۱- شبکه‌های عصبی پیچشی منطقه‌ای^۱

از آنجایی که CNN در تصاویری که از اشیا متفاوتی تشکیل شده است دچار مشکل می‌شود هم دقت پایینی دارد و هم سرعت کمتری دارد به همین دلیل بهبودهای زیادی برای این نوع الگوریتم ایجاد شده است که یکی از آن‌ها تقسیم کردن تصویر به بخش‌های کوچک‌تر به نام Region هست و از جستجوی انتخابی برای پیدا کردن این بخش‌ها استفاده می‌شود که در کل این رویکرد باعث می‌شود سرعت و دقت الگوریتم بهتر شود، بعد از این که این بخش‌ها به دست آمدند از الگوریتم CNN برای تشخیص اشیا موجود در تصویر استفاده می‌شود (Girshick *et al.*, 2014).

۳-۴-۱- شبکه‌های عصبی پیچشی منطقه‌ای

سریع (Fast-RCNN)^۲

R-CNN اولین روشی بود که منطقه‌های مختلف تصویر را با استفاده از یک الگوریتم تشخیص انتخابی (Selective Search) شناسایی کرده و سپس هر منطقه را به یک شبکه CNN جهت استخراج ویژگی‌ها می‌فرستاد. این روش دقت بالایی در تشخیص اشیا داشت، اما بسیار کند بود و نیاز به محاسبات زیادی برای هر منطقه داشت. یک شبکه سریع R-CNN یک تصویر کامل و یک مجموعه را به‌عنوان ورودی می‌گیرد، ابتدا کل تصویر را با چندین لایه convolutional (conv) و max pooling پردازش می‌کند تا یک نقشه ویژگی conv تولید کند. سپس، برای هر پیشنهاد شی، یک لایه ادغام منطقه مورد علاقه (ROI) یک بردار ویژگی با طول ثابت را از نقشه ویژگی استخراج می‌کند. (Girshick, 2015).

ابتدا تصاویر به ورودی داده می‌شوند سپس پیش‌پردازش قطعه‌بندی شامل فرآیند تقسیم‌بندی تصویر، بهبود تصویر و تبدیل فضای رنگی است. ابتدا تصویر دیجیتالی تصویر با یک پالایه بهبود می‌یابد. سپس هر تصویر را به یک آرایه تبدیل می‌شود. با استفاده از نام علمی Binarizes Diseases، نام هر تصویر به یک فیلد باینری تبدیل می‌شود و در نهایت طبقه‌بندی کننده‌های CNN برای شناسایی بیماری‌ها در هر کلاس گیاهی آموزش دیده‌اند، از نتایج سطح ۲ برای فراخوانی یک طبقه‌بندی استفاده می‌شود که برای طبقه‌بندی بیماری‌های مختلف در آن گیاه آموزش دیده است، اگر وجود نداشته باشد، برگ‌ها به‌عنوان "سالم" طبقه‌بندی می‌شوند (Kumar, 2021). مطالعه شبیه‌سازی و تجزیه و تحلیل بر روی تصاویر نمونه از نظر پیچیدگی زمانی و مساحت منطقه آلوده با تکنیک پردازش تصویر انجام می‌شود. در مطالعه مورد نظر در مجموع ۱۵ مورد به مدل تغذیه شده است که از این تعداد ۱۲ مورد مربوط به برگ‌های گیاه بیمار به نام‌های لکه باکتریایی کاغذ زنگوله‌ای، پژمردگی زودرس سیب‌زمینی، پژمردگی دیررس سیب‌زمینی، لکه هدف گوجه‌فرنگی، ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی، ویروس پیچ‌خوردگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی، پژمردگی زودرس گوجه‌فرنگی، پژمردگی دیررس گوجه‌فرنگی، کپک برگ گوجه‌فرنگی، لکه برگ گوجه‌فرنگی سپتوریا و کنه عنکبوتی گوجه‌فرنگی و ۳ مورد برگ سالم به نام‌های کاغذ زنگی سالم، سیب‌زمینی سالم و گوجه‌فرنگی سالم هست. روش پیشنهادی پیش‌بینی بیماری گیاه ورودی را از تصاویر برگ‌های گیاه می‌گیرد. ابتدا داده‌ها با تغییر اندازه تصاویر ورودی پیش‌پردازش می‌شوند و سپس یک آرایه برای آن ایجاد می‌شود. سپس مجموعه داده‌ها و برچسب همه تصاویر از هم جدا می‌شوند. این مدل که بر روی مجموعه داده مذکور آموزش داده شده است، به‌طور متوسط در تشخیص برگ‌های بیمار با دقت ۸۸٪ عمل کرده است. این نتیجه

¹Region-based Convolutional Neural Network

²Fast Region-based Convolutional Neural Network

۵-۲-۱- درخت تصمیم^۳

یکی دیگر از الگوریتم‌های یادگیری نظارت‌شده است که در مسائل طبقه‌بندی استفاده می‌شود، درخت تصمیم هست. این الگوریتم نیازی به تنظیم پارامتر یا دانش دامنه ندارد، بنابراین مناسب برای دانش اکتشافی است و می‌تواند داده‌های چندبعدی را مدیریت کند. مراحل یادگیری و طبقه‌بندی درخت تصمیم سریع و ساده است (Paul *et al.*, 2020). تشخیص به‌موقع و دقیق بیماری‌های برگ نقش عمده‌ای در جلوگیری از کاهش بهره‌وری و یا کاهش محصولات کشاورزی دارد. با استفاده از درخت تصمیم تشخیص به‌موقع بیماری برگ با دقت بالا و سرعت مناسب و همچنین نوع بیماری می‌تواند باعث بهبود کیفیت محصولات کشاورزی و همچنین میزان محصولات شود، که با استفاده از تصاویر برگ‌ها و درخت تصمیم دقت بسیار مناسب ۹۵٪ را در مدت‌زمان معقولی ارائه می‌کند (Rajesh *et al.*, 2020). رویکرد بهبودیافته درخت تصمیم از یک فن انتخاب ویژگی (ویژگی‌هایی را در دیتاست انتخاب می‌کند که تأثیر بیشتری در عملکرد الگوریتم دارند و از اضافه کردن ویژگی‌هایی که تأثیر چندانی در دقت الگوریتم ندارند خودداری می‌کند که باعث افزایش سرعت الگوریتم می‌شود به شکلی که تأثیر منفی روی دقت الگوریتم ندارد.) و نمونه‌برداری (RO (Randor Over) برای متعادل کردن دیتاست استفاده می‌کند. هدف اصلی این رویکرد افزایش عملکرد الگوریتم درخت تصمیم برای تشخیص بیماری سوپا است که دقت مناسب در مدت‌زمان مناسبی دارد (Bhatia *et al.*, 2020; Panahi *et al.*, 2022).

۶-۲-۱- جنگل‌های تصادفی^۴

جنگل‌های تصادفی طرحی است که در سال ۲۰۰۰ توسط Leo Breiman برای ساخت یک مجموعه پیش‌بینی‌کننده با مجموعه‌ای از درختان تصمیم‌گیری که در زیر فضاهای انتخابی تصادفی رشد می‌کنند، پیشنهاد شد (Biau, 2012). جنگل‌های تصادفی ترکیبی از پیش‌بینی‌کننده‌های درختی هستند به‌طوری که هر درخت به مقادیر یک بردار تصادفی که به‌طور مستقل و با توزیع یکسان برای همه درختان جنگل نمونه‌برداری شده است، بستگی دارد (Breiman, 2001). جنگل تصادفی (RF) یا جنگل تصمیم تصادفی یک مجموعه یادگیرنده است که با ساختن

۴-۲-۱- شبکه‌های عصبی پیچشی منطقه‌ای سریع‌تر^۱

هرچند شبکه‌های fast RCNN سریع‌تر و دقیق‌تر هستند نسبت به RCNN و CNN، ولی در دیتا ست‌های بزرگ باز هم عمل می‌کند و از روش جستجوی انتخابی استفاده می‌کند که سرعت الگوریتم را به نسبت کم می‌کند درحالی‌که در شبکه‌های Faster RCNN از روش RPN^۲ استفاده می‌کند، روش RPN به این صورت هست که یک تصویر به‌عنوان ورودی داده می‌شود و مجموعه‌ای از مستطیل‌ها که شامل اشیاء درون تصویر ورودی هست را به‌عنوان خروجی برمی‌گرداند، که باعث می‌شود که الگوریتم سریع‌تر عمل کرده و در دیتا ست‌های بزرگ که نیاز به زمان آموزش زیادی دارد به مشکل برنخورده و در مدت‌زمان کم به بهترین نتیجه دست یابد (Ren *et al.*, 2015).

تشخیص سریع بیماری گیاهان با استفاده از تصاویر برگ‌های گیاهان می‌توان از ضررهای زیاد در زمینه کشاورزی جلوگیری کرد. از الگوریتم Faster RCNN جهت تشخیص بیماری گیاه با استفاده از تصاویر برگ‌های گیاهان که به‌صورت دستی جمع‌آوری شده است استفاده می‌شود و در زمان معقولی می‌تواند تشخیص دهد که آیا گیاه موردنظر دچار بیماری خاصی هست یا نه و اگر دچار بیماری هست نام بیماری چیست؟ که موجب می‌شود سریع‌تر بیماری را تشخیص داده و گیاه موردنظر را درمان کند و از آسیب‌های جدی و ضررهای مالی جلوگیری نماید (Cynthia *et al.*, 2019).

بیماری‌ها چالش بزرگی برای بخش کشاورزی است. تشخیص دقیق و سریع بیماری‌ها در گیاهان می‌تواند زیان‌های اقتصادی را تا حد زیادی کاهش دهد. روشی مبتنی بر Faster RCNN برای تشخیص بیماری‌های گوجه‌فرنگی ارائه شده که RCNN سریع‌تر را با شبکه‌های عصبی پیچیده عمیق، از جمله resnet50، vgg16 و resnet101 ترکیب کرده و مجموعه داده‌های گوجه‌فرنگی مبتلابه بیماری و گوجه‌فرنگی سالم جمع‌آوری شده را آموزش و آزمایش کرده‌اند، که شامل شش تصویر گوجه‌فرنگی بیمار و تصاویر گوجه‌فرنگی سالم هست. نتایج تجربی نشان می‌دهد که سیستم پیشنهادی می‌تواند به‌طور مؤثر انواع مختلف بیماری‌های گوجه‌فرنگی را شناسایی کند (Wang & Qi, 2019).

1Faster Region-based Convolutional Neural Network

2Region Proposal Network

3Decision tree

4Radom Forest

زیرمجموعه‌ای از ژن‌های بیان شده متفاوت طبقه‌بندی کند (Shaik & Ramakrishna, 2014).

۲-۷-۲-۱- تجزیه و تحلیل تشخیص خطی (LDA)

یک روش ثابت شده برای انجام مشکلات کاهش ابعاد است که در پیش‌پردازش برای برنامه‌هایی مانند یادگیری ماشین، طبقه‌بندی الگوها، و غیره استفاده می‌شود. LDA بسته به هدف مطالعه، برای ترکیبی خطی از متغیرها دو کلاس را از هم جدا می‌کند (Paul et al., 2020).

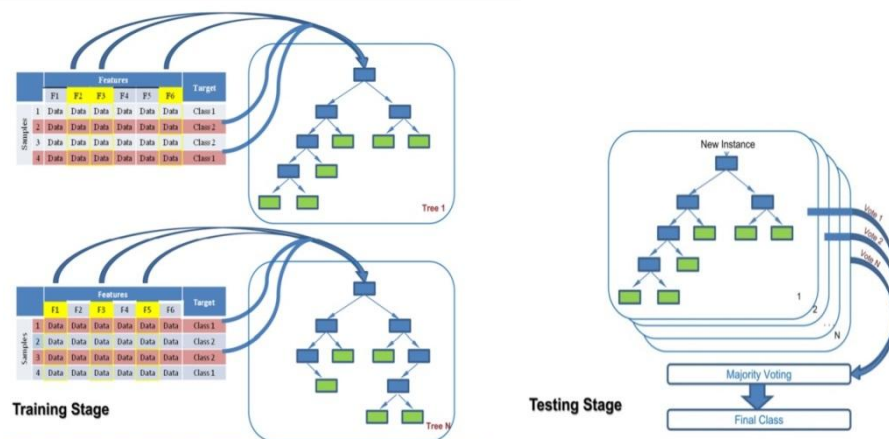
رگرسیون خطی به دلیل سادگی و قابلیت تفسیر در ژنومیک رایج است. از رگرسیون خطی برای ارزیابی اثرات core promoter element بر روی رونویسی و برای پیش‌بینی جهش‌های ژنی در نمونه‌های سرطانی بر اساس ویژگی‌های ژن استفاده می‌شود. با این حال، رگرسیون خطی هنگامی که برای تجزیه و تحلیل داده‌های با ابعاد بالا استفاده می‌شود، اغلب دارای خطای پیش‌بینی و واریانس بالایی است. معمولاً از الگوریتم‌های منظم‌سازی مانند رگرسیون ریبج (ridge)، رگرسیون کمند (lasso) و رگرسیون خالص الاستیک (elastic net) استفاده می‌شود. این روش‌ها در مجموع عملکرد بهتری نسبت به رگرسیون خطی نشان می‌دهند و در مطالعات گسترده ژنوم محبوبیت پیدا کرده‌اند. محققان از آن‌ها برای پیش‌بینی ارزش‌های اصلاح ژنومیک برای حیوانات و گیاهان بر اساس همه نشانگرهای مولکولی و برای شناسایی SNP‌های مربوط به صفات مورد علاقه استفاده کرده‌اند (Sun et al., 2020).

بسیاری از درختان تصمیم ضعیف برای طبقه‌بندی و رگرسیون ساخته شده است. نمونه‌های آموزش (Bootstrap) به صورت تصادفی از یک مجموعه داده اصلی برای ساختن درختان متعدد با جایگزینی نمونه‌ها انتخاب شده است. این احتمال وجود دارد که اصلاً هیچ نمونه‌ای را انتخاب نکنید یا نمونه‌ای را بیش از یک بار انتخاب کنید. درختان به بهترین شکل ممکن رشد می‌کنند، یعنی هرس انجام نمی‌شود. جنگل به حداکثر اندازه خود رشد می‌کند تا زمانی که هر گره خالص شود. اکثریت رای پیش‌بینی‌های همه درختان، تصمیم نهایی گروه را تعیین می‌کند. برای تست کردن داده‌های جدید، از میان تمام درختان تولید شده عبور می‌کند و هر درخت به یک کلاس رأی می‌دهد. کلاسی که حداکثر رأی را دریافت کند، کلاس انتخابی نهایی خواهد بود. شکل ۳ مراحل آموزش و آزمایش الگوریتم جنگل تصادفی را نشان می‌دهد (Virnodkar et al., 2020). با روش "کیسه" و ادغام آن‌ها برای به دست آوردن پیش‌بینی بهتر نتایج. مشابه SVM، random forest می‌تواند هم برای طبقه‌بندی و هم برای رگرسیون استفاده شود (Sun et al., 2020). در شکل ۴ انواع الگوریتم‌های یادگیری ماشین به صورت شماتیک نشان داده شده است (Silva et al., 2019).

۲-۷-۱- سایر الگوریتم‌های استفاده شده در فنوتیپ تنش

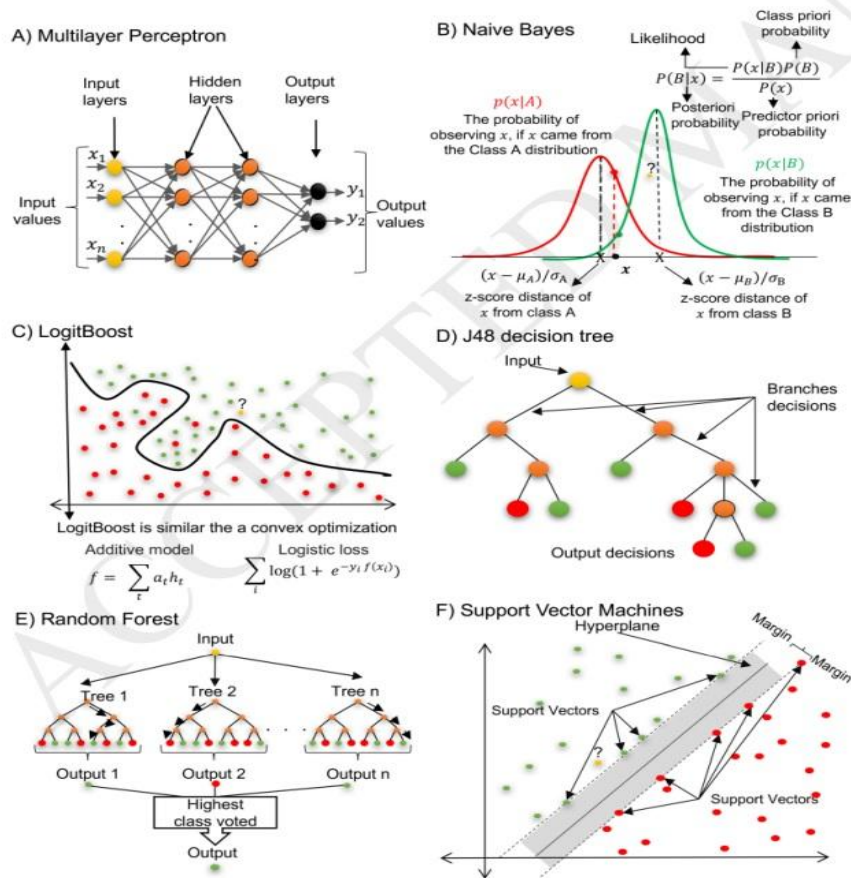
۱-۲-۷-۱- ماشین بردار پشتیبان بازگشتی^۱ (R-SVM)

یک مدل یادگیری ماشینی نظارت شده است و می‌تواند تنش‌های غیر زیستی و زیستی را با دقت ۱۰۰ درصد با استفاده از



شکل ۳. مراحل آموزش و آزمایش در الگوریتم جنگل تصادفی

1. Recursive-support vector machines
2. Linear Discriminate Analysis



شکل ۴. الگوریتم‌های یادگیری ماشین؛ A) شبکه عصبی مصنوعی. توپ‌های زرد نورون‌هایی هستند که لایه ورودی را تعریف می‌کنند. دایره‌های نارنجی نورون‌های حد واسط یا لایه‌های پنهان را مشخص می‌کنند. دایره‌های سیاه نورون‌هایی هستند که لایه‌های خروجی را مشخص می‌کنند. B) فرآیند تصمیم‌گیری احتمالی برای جداسازی کلاس‌های A (تراکم قرمز رنگ) و B (تراکم سبز رنگ) را نشان می‌دهد. نقاط قرمز و سبز یک نمونه داده از کلاس را طبقه‌بندی می‌کنند. نقطه زرد یک نمونه جدید را نشان می‌دهد که باید طبقه‌بندی شود. C) LogitBoost نوعی روش تقویتی است که یک رگرسیون لجستیک افزایشی را پیاده‌سازی می‌کند و احتمال a را به حداکثر می‌رساند. بهینه‌سازی محدب (Convex optimization)، طبقه‌بندی با روش‌های تقریبی است و نقاط قرمز نمونه‌هایی از کلاس‌های منفی را نشان می‌دهند، در حالی که نقاط سبز نشان‌دهنده کلاس‌های مثبت هستند. نقطه زرد نمونه جدیدی از داده‌ها را مشخص می‌کند که باید طبقه‌بندی شوند. D) درخت تصمیم. دایره زرد نشان‌دهنده داده‌های ورودی است. دایره نارنجی یک معیار تصمیم‌گیری میانی و دایره قرمز طبقه‌بندی نادرست را نشان می‌دهد. دایره سبز طبقه‌بندی درستی می‌دهد. E) جنگل تصادفی. نقطه زرد نشان‌دهنده داده‌های ورودی است. پس از چندین تصمیم تصادفی مختلف، درختان ساخته می‌شوند. دایره نارنجی معیارهای تصمیم‌گیری میانی را نشان می‌دهد. دایره قرمز نشان‌دهنده طبقه‌بندی نادرست است. دایره سبز نشان‌دهنده طبقه‌بندی صحیح است. F) ماشین بردار پشتیبانی. نقاط زرد نشان‌دهنده یک نمونه جدید برای طبقه‌بندی است (Silva et al., 2019).

چالش‌های مختلف حوزه کشاورزی به کار گرفته شده است. این روش دارای قدرت پیش‌بینی بیشتری است (Paul et al., 2020).

۴-۷-۲-۱- الگوریتم‌های مبتنی بر چگالی

مانند خوشه‌بندی فضایی مبتنی بر چگالی برنامه‌ها با نویز یا DBSCAN است. مزیت خوشه‌بندی مبتنی بر چگالی این است که شکل خوشه می‌تواند دلخواه باشد (Sun et al., 2020).

۳-۷-۲-۱- یادگیری عمیق

این یک زیر کلاس تنظیم‌شده از خانواده یادگیری ماشینی برای یادگیری و ارائه داده‌ها است که یک روش الگوریتمی مبتنی بر شبکه‌های عصبی مصنوعی با چندلایه است که از ساختار و عملکرد مغز انسان الهام گرفته شده است. اخیراً فن‌های یادگیری عمیق در

مورد عملکردهای miRNA نسبت به تنش‌های غیرزنده گیاهی بهبود می‌بخشد. NB برای پیش‌بینی تنش گیاه با داشتن غلظت miRNA به‌عنوان ورودی استفاده می‌شود (Vakilian, 2020; Yan & Wang, 2022).

۲-۳- K-mean

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای K-mean برای کشف پاسخ‌های ژنوتیپ‌های ماش در شرایط مختلف شور استفاده شد و نتایج نشان داد افزایش سطح تنش شوری اثرات نامطلوب شدید بر پارامترهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف مانند طول ریشه، طول ساقه، وزن ریشه، وزن اندام هوایی، کلروفیل-a، کلروفیل-b و محتوای فنلی دارد (Aslam et al.).

ارقام مختلف برنج ممکن است واکنش و مکانیسم‌های متفاوتی نسبت به خشکی داشته باشند. آنالیزهای فیزیولوژیکی و مقایسه پروتئومی برنج یاس تایلندی و دو رقم برنج چک در پاسخ به تنش خشکی با توجه به نتایج حاصل از خوشه‌بندی K-mean نشان داد که بیان پروتئین را می‌توان با توجه به تجمع بالای آن در هر رقم، به سه گروه طبقه‌بندی کرد (Maksup et al., 2014).

۲-۴- شبکه‌های عصبی

ANN ها برای بهینه‌سازی توابع سیگموئید متعلق به نورون‌های لایه پنهان به داده‌های آموزشی زیادی نیاز دارند. بنابراین، در تحقیقاتی که تعداد نمونه‌های آموزشی کم است، نمی‌توان فرآیند بهینه‌سازی را به‌درستی انجام داد. در مطالعاتی از جمله روابط بین غلظت miRNA و تنش گیاهی، استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی (ANN) به‌عنوان الگوریتم یادگیری امکان‌پذیر نیست زیرا شبکه‌های عصبی مصنوعی به داده‌های آموزشی زیادی نیاز دارند (Vakilian, 2020).

فرض شده است که با توضیح خواص پپتیدهای کوچک درگیر در تنش، شبکه‌های عصبی مصنوعی و روش‌های یادگیری ماشینی می‌توانند به طبقه‌بندی مؤثر این پپتیدهای کوچک کمک کنند (Tripathi et al., 2021).

۲-۵- جنگل‌های تصادفی

جنگل‌های تصادفی می‌توانند به‌طور مؤثر مجموعه‌های داده بزرگ را که دارای متغیرهای زیادی است مدیریت کنند و همچنین رتبه‌بندی نسبی ویژگی‌ها را ارائه می‌دهد که می‌تواند در

۲- کاربرد یادگیری ماشین در شناخت مکانیسم‌های

مولکولی

۲-۱- ماشین بردار پشتیبان

SVM و انواع آن پرکاربردترین الگوریتم‌ها برای پیش‌بینی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها هستند (Sun et al., 2020). همچنین SVM عملکرد خوبی برای پیش‌بینی پروتئین‌های مقاوم به بیماری در پنج گونه گیاهی داشت (Shaik & Ramakrishna, 2014).

ابزار PlantMiRNAPred طبقه‌بندی miRNA ها را بر اساس یک الگوریتم SVM برای پیش‌بینی پیش‌miRNA های گیاهی انجام می‌دهد و در کشف miRNA ها با توجه به ایمنی سیستم گیاهی کارآمد است (Daneshafrooz et al., 2022; Silva et al., 2019).

مقدار متوسط غلظت miRNA نسبت به سطوح مختلف تنش گیاه برای ساخت یک پایگاه داده مناسب برای یادگیری ماشین استفاده می‌شود. در تحقیقی که کیوان عاصف پور و کیلیان در سال ۲۰۲۰ انجام داد، عملکرد SVM نسبت به سایر روش‌های یادگیری ماشین در پیش‌بینی تنش گیاه بهتر بود. SVM توانست خروجی را با $R^2 = 0.96$ پیش‌بینی کند، به این معنی که اگر غلظت miRNA-396، miRNA-159، miRNA-169 و miRNA-393 را که به ترتیب بیشترین سهم را در پاسخ گیاه به خشکی، شوری، سرما و گرما داشتند در برگ گیاه Arabidopsis thaliana اندازه‌گیری کنیم، شانس خوبی برای پیش‌بینی تنش وجود دارد (Vakilian, 2020).

یادگیری ماشین همچنین برای انتخاب ژن‌های درگیر در تحمل شوری در برنج با استفاده از نوعی الگوریتم SVM (SVM-RFE) کارآمد است (Silva et al., 2019).

انواع مختلف فراوانی‌های ترکیبی توالی (فراوانی اسیدآمین، فراوانی دی‌پپتید، فراوانی تری‌پپتید، فراوانی‌های متعدد، بار و ترکیب آب‌گریزی) با بردارهای مشخص برای مدل‌های آموزشی با الگوریتم SVM برای پیش‌بینی پروتئین NBS-LRR استفاده شده است (Silva et al., 2019).

۲-۲- Naïve Bayes

فراوانی اسیدهای آمینه و طبقه‌بندی کننده ساده بیز برای پیش‌بینی پروتئین‌های ترشح شده قارچ‌های بیماری‌زا ترکیب شدند (Silva et al., 2019). یادگیری ماشینی دانش ما را در

پروموترها و مکان‌های اتصال پروتئین اعمال شود (Silva et al., 2019).

۸-۲- یادگیری ماشین و تجزیه و تحلیل شبکه

روش‌های یادگیری ماشینی و آماری برای تحلیل شبکه، یک چارچوب قابل دسترس برای تجزیه و تحلیل ساختاری نمودارها با کنار هم قرار دادن رویکردهای شناخته شده و جدید در کلاس‌های گراف و معیارهای گراف برای طبقه‌بندی فراهم می‌کند. از مجموعه داده‌های واقعی برای نمایش روش‌ها و موضوعات مورد بحث استفاده می‌شود که بررسی رویکردهای محاسباتی برای بازسازی و تقسیم شبکه‌های بیولوژیکی، مقدمه‌ای بر شبکه‌های پیچیده، ویژگی‌های آماری و مدل‌ها، مدل‌سازی برای شبکه‌های زیستی در حال تکامل، ساختار یک نمودار دویخشی تصادفی در حال تکامل، شمارش بر اساس چگالی در داده‌های سازمان‌یافته را شامل می‌شوند (Dehmer & Basak, 2012; Hesami et al., 2022).

۳- نتیجه‌گیری

یادگیری ماشین به استفاده از رایانه‌ها برای شبیه‌سازی فعالیت‌های یادگیری انسان و روش‌های خود به‌سازی رایانه‌ها می‌پردازد که برای به دست آوردن دانش و مهارت‌های جدید به‌طور مداوم عملکرد و دستاوردها را بهبود می‌بخشد. در واقع یادگیری ماشینی یک تکنیک داده‌کاوی هوشمند است که یک مدل پیش‌بینی را بر اساس یادگیری قبلی ایجاد می‌کند. در مقایسه با یادگیری انسان، یادگیری ماشینی سریع‌تر یاد می‌گیرد. رایانه‌ها بر جامعه انسانی تأثیر می‌گذارند و هرگونه پیشرفت انسان در زمینه یادگیری ماشینی باعث توسعه تحقیقات جدید در زمینه‌های نظری خواهد شد، بنابراین توسعه مدل‌ها و الگوریتم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر اساس بررسی منابع صورت گرفته، مشخص گردید الگوریتم‌های درخت تصمیم، ماشین بردار پشتیبان (SVM)، و شبکه‌های عصبی در تنش‌های زیستی نسبت به تنش‌های غیر زیستی کارآمدتر می‌باشند. این درحالی است که الگوریتم‌های مبتنی بر رگرسیون خطی، مدل‌های مارکوف، و روش‌های مبتنی بر تشخیص الگو در مطالعات مربوط به تنش‌های غیرزنده کارآمدتر می‌باشند. با این وجود مطالعه بیشتر و شناسایی الگوریتم‌های تشخیصی و روش‌های ترکیبی در تحقیقات آتی باید بیشتر مورد توجه قرار بگیرد.

تفسیر مدل و داده‌ها مفید باشد (Singh et al., 2017). بردار پشتیبان بازگشتی (R-SVM) و جنگل‌های تصادفی، ۱۹۶ ژن مشترک با دامنه پویا از سطوح بیان را در تنش‌های متعدد و مقاومت در برنج نشان دادند. ژن‌های شناسایی شده که به شدت تنش‌های غیر زیستی و زیستی را متمایز می‌کنند، به‌عنوان مؤلفه‌های کلیدی برای درک بیشتر ماهیت ذاتاً پیچیده پاسخ در تنش‌های متعدد در گیاهان کاربرد دارد (Shaik & Ramakrishna, 2014). در مطالعه‌ای، مدل‌های رگرسیون، یعنی درخت تصمیم (DT)، ماشین‌های بردار پشتیبان (SVMs)، و ساده بیز (NB) برای پیش‌بینی تنش گیاه با داشتن غلظت miRNAهای گیاهی استفاده شدند (Vakilian, 2020).

۶-۳- درخت تصمیم

مدل جنگل تصادفی چند کلاسه (MCRF) برای پیش‌بینی و تشخیص دسته‌های خاص پیتیدهای کوچک ترشح‌شده ناشی از استرس در گیاهان استفاده می‌شود. مشاهده شد که مدل پیشنهادی در زمان و هزینه صرفه‌جویی می‌کند (Tripathi et al., 2021).

RNAهای غیر کد کننده طویل (lncRNAs) در انواع فرآیندهای بیولوژیکی از جمله تنش دخیل هستند. برای پیش‌بینی lncRNA در گیاهان با استفاده از داده‌های رونویسی، PLncPRO مبتنی بر یادگیری ماشین و استفاده از الگوریتم جنگل تصادفی برای طبقه‌بندی رونوشت‌های کدگذاری و رونوشت‌های طولانی غیر کدگذاری استفاده می‌شود. با استفاده از الگوریتم جنگل تصادفی، با اطمینان بالا، ۳۷۱۴ و ۳۴۵۷ lncRNA به ترتیب در برنج و نخود و ویژگی‌های مختلف و بیان متفاوت تحت شرایط تنش خشکی یا شوری بررسی شد و lncRNAها از طریق RTqPCR تأیید شد (Singh et al., 2017). در زمینه‌های مختلف ژنومیک از جمله شناسایی ارتباط بین SNPها و صفات، شناسایی مکان‌های اتصال DNA به پروتئین نیز استفاده شده است (Sun et al., 2020).

۷-۲- یادگیری عمیق

یادگیری عمیق یک روش جدید ML است و برای شناسایی محل‌های اتصال پروتئین جدید استفاده شده است. الگوریتم DeepBind یک الگوریتم یادگیری عمیق است که بر بسیاری از الگوریتم‌های سنتی ML برتری دارد. DeepBind یک ابزار همه‌کاره است که می‌تواند برای ریزآرایه‌ها، داده‌های توالی یابی،

References

- Anim-Ayeko, A. O., Schillaci, C., & Lipani, A. (2023). Automatic blight disease detection in potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum*, L. 1753) plants using deep learning. *Smart Agricultural Technology*, 4, 100178.
- Arora, A., Misra, T., Kumar, M., Marwaha, S., Kumar, S., & Chinnusamy, V. (2023). Computer Vision Approaches for Plant Phenotypic Parameter Determination. In *Digital Ecosystem for Innovation in Agriculture* (pp. 263-270). Springer.
- Aslam, M., Maqbool, M. A., Zaman, Q. U., & Akhtar, M. A. Uncovering the tolerance of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) genotypes under saline conditions using k-mean cluster analysis.
- Behmann, J., Schmitter, P., Steinrücken, J., & Plümer, L. (2014). Ordinal classification for efficient plant stress prediction in hyperspectral data. *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, 40, 29-36.
- Bhatia, A., Chug, A., & Singh, A. P. (2020). Plant disease detection for high dimensional imbalanced dataset using an enhanced decision tree approach. *International Journal of Future Generation Communication and Networking*, 13(4), 71-78.
- Biau, G. (2012). Analysis of a random forests model. *The Journal of Machine Learning Research*, 13, 1063-1095.
- Bock, C., Poole, G., Parker, P., & Gottwald, T. (2010). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical reviews in plant sciences*, 29(2), 59-107.
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine learning*, 45(1), 5-32.
- Calderón, R., Navas-Cortés, J. A., & Zarco-Tejada, P. J. (2015). Early detection and quantification of *Verticillium* wilt in olive using hyperspectral and thermal imagery over large areas. *Remote Sensing*, 7(5), 5584-5610.
- Cen, H., Weng, H., Yao, J., He, M., Lv, J., Hua, S., Li, H., & He, Y. (2017). Chlorophyll fluorescence imaging uncovers photosynthetic fingerprint of citrus Huanglongbing. *Frontiers in plant science*, 8, 1509.
- Cervantes, J., Garcia-Lamont, F., Rodríguez-Mazahua, L., & Lopez, A. (2020). A comprehensive survey on support vector machine classification: Applications, challenges and trends. *Neurocomputing*, 408, 189-215.
- Cynthia, S. T., Hossain, K. M. S., Hasan, M. N., Asaduzzaman, M., & Das, A. K. (2019). Automated detection of plant diseases using image processing and faster R-CNN algorithm. 2019 International Conference on Sustainable Technologies for Industry 4.0 (STI),
- Daneshafrooz, N., Bagherzadeh Cham, M., Majidi, M., & Panahi, B. (2022). Identification of potentially functional modules and diagnostic genes related to amyotrophic lateral sclerosis based on the WGCNA and LASSO algorithms. *Scientific reports*, 12(1), 20144.
- Das Choudhury, S., Guadagno, C. R., Bashyam, S., Ewers, B. E., & Samal, A. Stress Phenotyping Analysis Leveraging Autofluorescence Image Sequences with Machine Learning. *Frontiers in plant science*, 15, 1353110.
- Dehmer, M., & Basak, S. C. (2012). *Statistical and machine learning approaches for network analysis*. Wiley Online Library.
- Ghahramani, N., Shodja, J., Rafat, S. A., Panahi, B., & Hasanpur, K. (2021). Integrative systems biology analysis elucidates mastitis disease underlying functional modules in dairy cattle. *Frontiers in Genetics*, 12, 712306.
- Gill, T., Gill, S. K., Saini, D. K., Chopra, Y., de Koff, J. P., & Sandhu, K. S. (2022). A comprehensive review of high throughput phenotyping and machine learning for plant stress phenotyping. *Phenomics*, 2(3), 156-183.
- Girshick, R. (2015). Fast r-cnn. Proceedings of the IEEE international conference on computer vision,
- Girshick, R., Donahue, J., Darrell, T., & Malik, J. (2014). Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation. Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition,
- Gou, C., Zafar, S., Hasnain, Z., Aslam, N., Iqbal, N., Abbas, S., Li, H., Li, J., Chen, B., & Ragauskas, A. J. (2024). Machine and Deep Learning: Artificial Intelligence Application in Biotic and Abiotic Stress Management in Plants. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 29(1), 20.
- Hesami, M., Alizadeh, M., Jones, A. M. P., & Torkamaneh, D. (2022). Machine learning: Its challenges and opportunities in plant system biology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(9-10), 3507-3530.

- Holasou, H. A., Panahi, B., Shahi, A., & Nami, Y. (2024). Integration of machine learning models with microsatellite markers: New avenue in world grapevine germplasm characterization. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *38*, 101678.
- Islam, M., Dinh, A., Wahid, K., & Bhowmik, P. (2017). Detection of potato diseases using image segmentation and multiclass support vector machine. 2017 IEEE 30th canadian conference on electrical and computer engineering (CCECE),
- Kaiser, E., Von Gillhaussen, P., Clarke, J., & Schurr, U. (2024). IPPS 2022-plant phenotyping for a sustainable future. *Frontiers in plant science*, *15*, 1383766.
- Kaundal, R., Kapoor, A. S., & Raghava, G. P. (2006). Machine learning techniques in disease forecasting: a case study on rice blast prediction. *BMC bioinformatics*, *7*(1), 1-16.
- Kumar, S. (2021). Plant disease detection using CNN. *Turkish Journal of Computer and Mathematics Education (TURCOMAT)*, *12*(12), 2106-2112.
- Maksup, S., Roytrakul, S., & Supaibulwatana, K. (2014). Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. *Journal of plant interactions*, *9*(1), 43-55.
- Meraj, T., Sharif, M. I., Raza, M., Alabrah, A., Kadry, S., & Gandomi, A. H. (2024). Computer vision-based plants phenotyping: A comprehensive survey. *Isience*, *27*(1).
- Naik, H. S., Zhang, J., Lofquist, A., Assefa, T., Sarkar, S., Ackerman, D., Singh, A., Singh, A. K., & Ganapathysubramanian, B. (2017a). A real-time phenotyping framework using machine learning for plant stress severity rating in soybean. *Plant methods*, *13*, 1-12.
- Naik, H. S., Zhang, J., Lofquist, A., Assefa, T., Sarkar, S., Ackerman, D., Singh, A., Singh, A. K., & Ganapathysubramanian, B. (2017b). A real-time phenotyping framework using machine learning for plant stress severity rating in soybean. *Plant methods*, *13*(1), 1-12.
- Niazian, M., & Niedbala, G. (2020). Machine learning for plant breeding and biotechnology. *Agriculture*, *10*(10), 436.
- Panahi, B., Frahadian, M., Dums, J. T., & Hejazi, M. A. (2019). Integration of cross species RNA-Seq meta-analysis and machine-learning models identifies the most important salt stress-responsive pathways in microalga *Dunaliella*. *Frontiers in Genetics*, *10*, 752.
- Panahi, B., Mohammadi, S. A., & Doulati-Baneh, H. (2020). Characterization of Iranian grapevine cultivars using machine learning models. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *90*, 615-621.
- Panahi, B., Tajaddod, S., Mohammadzadeh Jallali, H., Hejazi, M. A., & Zeinalabedini, M. (2022). Variability and association among some pomological and physiochemical traits in spring frost tolerant genotypes of Persian walnut (*Juglans regia* L.) and selection of genotypes with superior traits based on machine learning algorithms. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-13.
- Paul, A., Ghosh, S., Das, A. K., Goswami, S., Choudhury, S. D., & Sen, S. (2020). A review on agricultural advancement based on computer vision and machine learning. In *Emerging technology in modelling and graphics* (pp. 567-581). Springer.
- Peña, J. M., Torres-Sánchez, J., Serrano-Pérez, A., De Castro, A. I., & López-Granados, F. (2015). Quantifying efficacy and limits of unmanned aerial vehicle (UAV) technology for weed seedling detection as affected by sensor resolution. *Sensors*, *15*(3), 5609-5626.
- Pierz, L. D., Heslinga, D. R., Buell, C. R., & Haus, M. J. (2023). An image-based technique for automated root disease severity assessment using PlantCV. *Applications in Plant Sciences*, *11*(1), e11507.
- Pound, M. P., Atkinson, J. A., Townsend, A. J., Wilson, M. H., Griffiths, M., Jackson, A. S., Bulat, A., Tzimiropoulos, G., Wells, D. M., & Murchie, E. H. (2017). Deep machine learning provides state-of-the-art performance in image-based plant phenotyping. *Gigascience*, *6*(10), gix083.
- Pujari, D., Yakkundimath, R., & Byadgi, A. S. (2016). SVM and ANN based classification of plant diseases using feature reduction technique. *IJIMAI*, *3*(7), 6-14.
- Rajesh, B., Vardhan, M. V. S., & Sujihelen, L. (2020). Leaf disease detection and classification by decision tree. 2020 4th International Conference on Trends in Electronics and Informatics (ICOEI)(48184),
- Raza, S.-e.-A., Smith, H. K., Clarkson, G. J., Taylor, G., Thompson, A. J., Clarkson, J., & Rajpoot, N. M. (2014). Automatic detection of regions in spinach canopies responding to soil moisture deficit using combined visible and thermal imagery. *Plos one*, *9*(6), e97612.
- Ren, S., He, K., Girshick, R., & Sun, J. (2015). Faster r-cnn: Towards real-time object detection with region proposal networks. *Advances in neural information processing systems*, *28*.

- Reza, M. N., Na, I. S., Baek, S. W., & Lee, K.-H. (2019). Rice yield estimation based on K-means clustering with graph-cut segmentation using low-altitude UAV images. *Biosystems engineering*, 177, 109-121.
- Sadeghi, M., Panahi, B., Mazlumi, A., Hejazi, M. A., Komi, D. E. A., & Nami, Y. (2022). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria with antimicrobial properties and selection of superior bacteria for application as biocontrol using machine learning models. *LWT*, 162, 113471.
- Sari, W. E., Kurniawati, Y. E., & Santosa, P. I. (2020). Papaya Disease Detection Using Fuzzy Naïve Bayes Classifier. 2020 3rd International Seminar on Research of Information Technology and Intelligent Systems (ISRITI),
- Sarkar, C., Gupta, D., Gupta, U., & Hazarika, B. B. (2023). Leaf disease detection using machine learning and deep learning: Review and challenges. *Applied Soft Computing*, 110534.
- Seka, D., Bonny, B., Yoboué, A., Sié, S., & Adopo-Gourène, B. (2019). Identification of maize (*Zea mays* L.) progeny genotypes based on two probabilistic approaches: Logistic regression and naïve Bayes. *Artificial intelligence in agriculture*, 1, 9-13.
- Shaik, R., & Ramakrishna, W. (2014). Machine learning approaches distinguish multiple stress conditions using stress-responsive genes and identify candidate genes for broad resistance in rice. *Plant physiology*, 164(1), 481-495.
- Shoab, M., Shah, B., Ei-Sappagh, S., Ali, A., Ullah, A., Alenezi, F., Gechev, T., Hussain, T., & Ali, F. (2023). An advanced deep learning models-based plant disease detection: A review of recent research. *Frontiers in plant science*, 14, 1158933.
- Shrestha, G., Das, M., & Dey, N. (2020). Plant disease detection using CNN. 2020 IEEE Applied Signal Processing Conference (ASPCON),
- Silva, J. C. F., Teixeira, R. M., Silva, F. F., Brommonschenkel, S. H., & Fontes, E. P. (2019). Machine learning approaches and their current application in plant molecular biology: A systematic review. *Plant Science*, 284, 37-47.
- Singh, A., Ganapathysubramanian, B., Singh, A. K., & Sarkar, S. (2016). Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends in plant science*, 21(2), 110-124.
- Singh, A. K., Ganapathysubramanian, B., Sarkar, S., & Singh, A. (2018). Deep learning for plant stress phenotyping: trends and future perspectives. *Trends in plant science*, 23(10), 883-898.
- Singh, U., Khemka, N., Rajkumar, M. S., Garg, R., & Jain, M. (2017). PLncPRO for prediction of long non-coding RNAs (lncRNAs) in plants and its application for discovery of abiotic stress-responsive lncRNAs in rice and chickpea. *Nucleic acids research*, 45(22), e183-e183.
- Sun, S., Wang, C., Ding, H., & Zou, Q. (2020). Machine learning and its applications in plant molecular studies. *Briefings in functional genomics*, 19(1), 40-48.
- Tahmasebi, A., Niazi, A., & Akrami, S. (2023). Integration of meta-analysis, machine learning and systems biology approach for investigating the transcriptomic response to drought stress in *Populus* species. *Scientific reports*, 13(1), 847.
- Tripathi, A., Goswami, T., Trivedi, S. K., & Sharma, R. D. (2021). A multi class random forest (MCRF) model for classification of small plant peptides. *International Journal of Information Management Data Insights*, 1(2), 100029.
- Trivedi, V. K., Shukla, P. K., & Pandey, A. (2022). Automatic segmentation of plant leaves disease using min-max hue histogram and k-mean clustering. *Multimedia Tools and Applications*, 81(14), 20201-20228.
- Vakilian, K. A. (2020). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- van Dijk, A. D. J., Kootstra, G., Kruijer, W., & de Ridder, D. (2021). Machine learning in plant science and plant breeding. *Iscience*, 24(1), 101890.
- Virnodkar, S. S., Pachghare, V. K., Patil, V., & Jha, S. K. (2020). Remote sensing and machine learning for crop water stress determination in various crops: a critical review. *Precision Agriculture*, 21(5), 1121-1155.
- Wang, Q., & Qi, F. (2019). Tomato diseases recognition based on faster RCNN. 2019 10th International Conference on Information Technology in Medicine and Education (ITME),
- Wetterich, C. B., Kumar, R., Sankaran, S., Junior, J. B., Ehsani, R., & Marcassa, L. G. (2013). A comparative study on application of computer vision and fluorescence imaging spectroscopy for detection of citrus huanglongbing disease in USA and Brazil. *Laser Science*,
- Xu, X., Li, H., Yin, F., Xi, L., Qiao, H., Ma, Z., Shen, S., Jiang, B., & Ma, X. (2020). Wheat ear counting using K-means clustering segmentation and convolutional neural network. *Plant methods*, 16, 1-13.

- Yadav, J., & Sharma, M. (2013). A Review of K-mean Algorithm. *Int. J. Eng. Trends Technol*, 4(7), 2972-2976.
- Yan, J., & Wang, X. (2022). Unsupervised and semi-supervised learning: the next frontier in machine learning for plant systems biology. *The Plant Journal*, 111(6), 1527-1538.
- Zhou, J., Fu, X., Zhou, S., & Zhou, J. (2018). Evaluation of the performance of machine learning methods in soybean segmentation for image-based high-throughput phenotyping in greenhouse. 2018 ASABE Annual International Meeting,
- Zubler, A. V., & Yoon, J.-Y. (2020). Proximal Methods for Plant Stress Detection Using Optical Sensors and Machine Learning. *Biosensors*, 10(12), 193.