

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی

در میوه سیب تیمار شده با عصاره گیاهی و عامل بیماری *Penicillium expansum*

جلال غلام نژاد^۱✉، روح اله تقی‌زاده مهرجردی^۱ و فاطمه ناصری‌نسب^۲

۱- به ترتیب استادیار و استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد، ایران

۲- دانش‌آموخته‌ی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷)

چکیده

استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان یک جایگزین مناسب به جای مصرف سموم در رابطه با بیماری‌های بعد از برداشت و به خصوص بیماری کپک آبی مطرح بوده است. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های درگیر در فعالیت‌های دفاعی گیاهی روشی کارآمد و در عین حال هزینه‌بر در ارزیابی سطح بیماری می‌باشد. در این تحقیق ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در هشت روز متوالی در میوه سیب که تحت تیمارهای مختلف عصاره اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) و فارچ بیمارگر *Penicillium expansum* قرار گرفته بود بررسی شد. سپس بر اساس اطلاعاتی که از این آزمون به دست آمد با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و مدل نروفازی فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد در روز پنجم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای قبل در سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره مشاهده شد و این افزایش نسبت به تیمارهای دیگر معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در همه تیمارها به غیر از شاهد سالم در این روز مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که مدل نروفازی کارایی بالاتری را جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سایر مدل‌ها دارد. لذا در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود از مدل نامبرده جهت پیش‌بینی رفتار آنزیم‌ها استفاده شود، همچنین کاربرد چنین روش‌هایی هزینه و زمان آزمایش را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، چند متغیره، رگرسیون شبکه عصبی، نروفازی، *Penicillium expansum*.

The evaluation of peroxidase using multivariate regression models, neural networks and neuro-fuzzy in apple fruit treated with plant extract and *Penicillium expansum*

J. GHOLAMNEZHAD¹✉, R. TAGHIZADEH-MEHRJARDI¹ and F. NASERINASAB²

1- Assistant Professor & Assistant Professor, Respectively; Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University,

Yazd, Iran; 2- Ph.D. Graduate, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

The use of plant extracts can consider as an alternative for pesticides, to control post-harvest diseases like apple blue mold. It was efficient method the measuring the enzymes activity involved in plant defense systems to evaluate the disease, but it was expensive method. At present research, the peroxidase activity in treated apple fruits with lavender extracts and pathogen during eight days was investigated. Then, we applied three common models (i.e. multiple linear regression models, neural networks and neuro-fuzzy) to predict the peroxidase activity based on the information of the previous test. The results showed the highest enzyme activity was observed in the infected apples treated with the extract in fifth days, as the days before and it was significant compared to other treatments. The most activity of peroxidase was observed in all treatments except control, was observed on the fifth day. Our constructed models revealed that neuro-fuzzy model had higher performance in the peroxidase activity prediction compared with the other models.

Key words: Neural network, Neuro-fuzzy, Multivariate regression, *Penicillium expansum*, Peroxidase, Systemic Acquired Resistance.

✉ Corresponding author: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

مقدمه

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و کشاورزی در ایران محسوب می‌شود. بر اساس آمار وزارت جهاد کشاورزی، میزان تولید سیب در کشور طی پنج سال (۸۸ الی ۹۲) سالانه به طور متوسط ۱/۷ درصد رشد داشته و از ۲۸۵۴ هزار تن در سال ۱۳۸۸ به ۳۰۵۰ هزار تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است. طی این سال‌ها، تولید سیب در بین محصولات باغی، همواره رتبه اول را داشته است. نظر به تولید زیاد این محصول در یک فصل، نیاز این محصول به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است. از طرف دیگر به علت نبود انبارها با تکنولوژی به روز، این محصول در معرض خسارات زیادی از جمله بیماری‌های قارچی است (Janisiewicz and Korentent, 2002). یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که در انبار به این محصول خسارت وارد می‌کند بیماری کپک آبی سیب با عامل گونه‌های مختلف جنس *Penicillium Link* (1809) است (Gholamnejad et al., 2009). استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی یکی از سریع‌ترین راه‌های مبارزه با بیمارهای گیاهی است، اما آسیب به محیط زیست و سلامت انسان از یک طرف و مقاومت عوامل بیماری‌زا به ترکیبات شیمیایی از طرف دیگر، محققان را بر آن داشت که به دنبال روشی جهت جلوگیری از آثار مخرب این ترکیبات باشند (Gholamnejad et al., 2009).

استفاده از عصاره‌های ترکیباتی با منشأ طبیعی، یکی از روش‌هایی است که آثار سوئی بر سلامت انسان ندارد، سریع تجزیه می‌شود و تا کنون گزارشی مبنی بر مقاومت بیمارگرها نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است (Bakkali et al., 2008). عصاره‌های گیاهی علاوه بر اینکه خاصیت ضد میکروبی دارند قادرند بعضی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر عوامل میکروبی از جمله قارچ‌ها فعال کنند. یکی از این مکانیسم‌های دفاعی افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز است (Daayf et al., 1997). اثر عصاره برگ گیاه *Reynoutria sachalinensis* در القا مقاومت و کنترل

سفیدک پودری خیار توسط محققین مختلفی به اثبات رسیده است (Herger et al., 1988).

آنزیم‌های درگیر در فعالیت‌های دفاعی گیاهی، اولین جبهه دفاعی گیاهان در برابر عامل بیماری‌زا هستند و اندازه گیری فعالیت آنها روشی کارآمد در ارزیابی سطح بیماری است. اما معمولاً اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در دوره زمانی فرآیندی وقت‌گیر و هزینه‌بر می‌باشد. لذا در سال‌های اخیر محققین تلاش دارند تا با استفاده از مدل‌های داده‌کاوی و پیش‌بینی کننده، اقدام به پیش‌بینی این پارامترها کنند. داده‌کاوی یک حوزه میان رشته‌ای و با رشد سریع است که حوزه‌های مختلفی همچون پایگاه داده، آمار، یادگیری ماشین و سایر زمینه‌های مرتبط را با هم تلفیق کرده است تا اطلاعات و دانش ارزشمند نهفته در حجم بزرگی از داده‌ها را استخراج نماید (Han et al., 2011). داده‌کاوی بخشی از فرآیند کشف دانش است. انواع روش‌های داده‌کاوی از قبیل رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون درختی جهت پیش‌بینی آنزیم‌ها استفاده شده است. به عنوان مثال جواد زرین و متشعزاده جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان در شاخساره گندم نان از مدل‌های رگرسیون چند متغیره و شبکه عصبی مصنوعی استفاده کردند و بیان داشتند که مدل شبکه عصبی مصنوعی دارای کارایی بالاتری جهت پیش‌بینی آنزیم مورد نظر بوده است (Javad Zarin and Moteshare Zadeh, 2016). در تحقیق حاضر، در ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در هشت روز متوالی در میوه سیب که تحت تیمارهای مختلف عصاره بیمارگر و *Penicillium expansum* قرار گرفته بود بررسی و سپس بر اساس اطلاعاتی که از این آزمون به دست آمد با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و مدل نروفازی فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت همین تیمارها در میوه سیب پیش‌بینی شد.

روش بررسی

عامل بیماری: در این بررسی قارچ بیمارگر *Penicillium sp.*

کشت PDA تهیه شد. ابتدا یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور شد. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیاز که 10^6 کنیدیوم در هر میلی لیتر آب مقطر سترون بود، با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد (Batta, 2004). پس از گذشت یک ساعت و خشک شدن زخم‌ها، محل زخم با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ بیمارگر، مایه‌زنی شد. پس از خشک شدن زخم‌ها میوه‌ها به وسیله محلول‌های تهیه شده از عصاره با غلظت چهار هزار محلول پاشی به صورتی که درون زخم‌ها نیز تیمار شدند و سپس در ظروف یکبار مصرف بسته بندی شده و به مدت یک هفته در اتاق کشت با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰٪ در شرایط سترون نگهداری شد. بعد از طی دوره نگهداری زخم‌ها از نظر ایجاد پوسیدگی چهار بار (هر پنج روز یکبار)، بررسی شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد.

در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل سه میوه و هر میوه دارای سه زخم بود. سیب‌های محلول‌پاشی شده با توئین ۸۰ بدون اسپور قارچ به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد (Etebarian *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز در سیب‌های

تیمار شده با قارچ عامل بیماری و عصاره در انبار در دمای چهار درجه سلسیوس: به منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز از سیب‌هایی که در بند قبل در مورد آن‌ها توضیح داده شد نمونه برداری شد.

در این آزمایشات تیمارها شامل شاهد سالم (سیب‌های مایه زنی شده با آب مقطر سترون)، سیب‌هایی که تنها با عصاره مایه زنی شده بود، سیب‌های آلوده که فقط اینوکولوم قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بود و سیب‌های که با قارچ عامل بیماری و عصاره مایه زنی شده بودند. برای هر

از سردخانه نعیم آباد شهر یزد از روی سیب آلوده به بیماری کپک آبی، جداسازی و در این مطالعه استفاده شد. قارچ عامل بیماری روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این قارچ بعد از جداسازی در حد گونه *Penicillium expansum* توسط کلیدهای مربوطه شناسایی شد.

مواد گیاهی: در این تحقیق، از عصاره گیاه اسطوخودوس

(برگ) (*Lavandula officinalis*) استفاده شد. این گیاهان ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس به هیپوکلریت ۰/۲٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون سه مرتبه شسته و در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شد (Alam *et al.*, 2011)، سپس اندام‌های هوایی آنها به وسیله خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شد (Abdulaziz *et al.*, 2010).

عصاره‌های گیاهی با استفاده از آب به عنوان حلال

استخراج شد. در این روش پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون خیسانده و پس از ۲۴ ساعت از پارچه ملامل عبور و سانتریفوژ شد. در این مرحله به منظور سترون نمودن عصاره آبی از صافی میکروبیولوژیک دو میکرونی استفاده شد (Azimi *et al.*, 2006).

بررسی اثر عصاره اسطوخودوس بر میزان فعالیت

آنزیم پراکسیداز روی میوه سیب در انبار چهار درجه سانتی‌گراد: در این آزمون از میوه‌های سالم و بدون زخم رقم Golden delicious که از میادین میوه شهرستان یزد تهیه شده بود استفاده شد و نهایت دقت در استفاده از رقم مشابه به عمل آمد. در این آزمایش‌ها سعی بر استفاده از میوه‌ها با اندازه یکسان بوده است. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور و سپس دوبار با آب سترون شستشو داده و در نهایت به مدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شد، سپس توسط یک سوزن سترون سه حفره به قطرهای ۱/۵ mm و عمق ۳ mm در هر سیب ایجاد شد. اسپورهای قارچ بیمارگر از کشت چهار روزه روی محیط

تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

آزمایشات به صورت آزمایش فاکتوریل 4×8 که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل (۸ زمان نمونه برداری یعنی هشت روز بعد از مایه زنی با قارچ عامل بیماری) بود در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل و سنجش پروتئین

استاندارد: به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش برادفورد (Bradford, 1967) استفاده شد.

تهیه عصاره آنزیمی پراکسیداز: برای بررسی فعالیت

آنزیم پراکسیداز از روش Gong et al. (2001) با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا هاون چینی در ظرف یخ قرار داده شد. سپس یک گرم از بافت میوه در داخل هاون قرار داده شد و با سه میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر هفت کاملاً مخلوط شد. پس از به دست آمدن یک مخلوط هموژن، مخلوط حاصل بلافاصله به داخل ویال‌های دو میلی لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ در $14000g$ به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای اندازه گیری فعالیت آنزیم در فریزر در $20-^{\circ}C$ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): ارزیابی

فعالیت پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company-Unterfoehring-germany انجام شد. تغییرات جذب (در 485 nm با فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه) در دقیقه در میلی گرم پروتئین به عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد.

پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): در

تحقیق حاضر از انواع روش‌های داده کاوی از قبیل رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی جهت پیش‌بینی آنزیم مورد نظر استفاده گردید. در تمام مدل‌های مورد بررسی میزان فعالیت آنزیم با تأخیر یک روز به عنوان

ورودی مدل و میزان آنزیم در فردای آن روز به عنوان خروجی مدل در نظر گرفته شد. بدین ترتیب به عنوان مثال میزان فعالیت آنزیم در روز ششم ورودی برای میزان آنزیم در روز هفتم قرار داده شد.

رگرسیون چند متغیره خطی: شکل کلی معادله رگرسیون

کلاسیک به صورت رابطه (۱) می باشد:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n \quad (1)$$

که در آن، Y متغیر خروجی (فعالیت آنزیم)، x_i ها متغیر ورودی (میزان فعالیت آنزیم در روز بعد) و a ضرایب معادله به حساب می‌آیند. معمولاً با روش کمترین مربعات برای برآورد ضرایب رگرسیون خطی چندگانه استفاده می‌شود.

شبکه عصبی مصنوعی: در این پژوهش شبکه پرسپترون

با یک لایه مخفی که دارای تابع فعال‌سازی سیگموئید در لایه مخفی و تابع فعال‌سازی خطی در لایه خروجی بوده و تعداد نرون‌های آن از یک تا ۱۰ نرون متغیر بوده و بهترین تعداد نرون به صورت سعی و خطا تعیین شد، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، به علت کارایی، سادگی و سرعت بالا در این تحقیق الگوریتم آموزشی لونبرگ مارکواریت استفاده شد (Amini et al., 2005).

در پژوهش حاضر از نرم‌افزار نروسولوشین

(Neurosolutions) نسخه پنج برای طراحی شبکه عصبی مصنوعی و در نهایت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم استفاده شد. در روش شبکه عصبی مصنوعی قبل از ورود داده‌ها به شبکه باید یکسری پیش پردازش‌ها روی داده‌های ورودی صورت گیرد. در صورتی که داده‌ها به صورت خام وارد شبکه شوند به علت تغییرات زیاد داده‌ها تاثیر متفاوتی بر روی شبکه گذاشته بطوری که برخی از نرون‌های خیلی زود به حد آتش^۱ رسیده در حالی که برخی دیگر از نرون‌ها حتی به آستانه فعالیت نیز نرسیده‌اند. لذا در ابتدا لازم است که داده‌ها معیار سازی شوند، یعنی بین یک دامنه عددی که معمولاً (۰ و ۱) می‌باشد قرار گیرند. اگر تابع سیگموئید را در نظر بگیریم

۱-Firing Rate

می‌کند. در چنین شرایطی بهترین گزینه برای اعتبارسنجی مدل نقشه‌برداری رقومی، اعتبارسنجی به روش حذف داده و پیش‌بینی آن است. پایگاه داده (n) به n-1 موقعیت برای واسنجی و یک موقعیت برای اعتبارسنجی تقسیم می‌شود. در هر تکرار، مدل برای موقعیت حذف شده اجرا می‌گردد و متغیر حذف شده پیش‌بینی می‌گردد. سپس با مقدار واقعی مقایسه می‌گردد و خطای پیش‌بینی محاسبه می‌شود. این فرآیند برای همه موقعیت‌های نمونه‌برداری انجام می‌شود. پس از تعیین مدل مناسب، با استفاده از ضریب تبیین بین مقادیر واقعی و برآورد شده فعالیت آنزیم و همچنین با استفاده از محاسبه شاخص‌های میانگین ریشه مربعات خطا و میانگین خطای مدل اعتبارسنجی شد. که در آن‌ها؛ X_e و X_0 به ترتیب فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده و تخمین زده شده، \bar{X}_e و \bar{X}_0 به ترتیب میانگین فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده و تخمین زده شده و n تعداد داده‌ها است.

$$RMSE = \left[\frac{\sum (X_0 - X_e)^2}{n} \right]^{1/2} \quad (3)$$

$$R^2 = \left[\frac{\sum ((X_e - \bar{X}_e)(X_0 - \bar{X}_0))}{\sqrt{\sum ((X_e - \bar{X}_e)^2)(X_0 - \bar{X}_0)^2}} \right]^2 \quad (4)$$

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_0 - X_e) \quad (5)$$

نتیجه و بحث

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز: در روز اول سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره گیاه اسطوخودوس از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سیب‌های سالم شاهد و همچنین سیب‌های سالم تیمار شده با عصاره گیاهی تنها، افزایش معنی داری نشان دادند اما در مقایسه با سیب‌های آلوده با بیمارگر تنها اختلافی نشان ندادند. سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره در روز دوم با بقیه تیمارها در این روز دارای اختلاف معنی دار بود، و این اختلاف معنی‌دار تا پایان روز هشتم نمونه‌برداری وجود داشت. در روز پنجم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای قبل در سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره دیده شد و این افزایش نسبت به تیمارهای

مشاهده می‌شود شیب این تابع در محدوده ۰ تا ۱ زیاد بوده، و به تدریج که به صفر و یک نزدیک می‌شود شیب آن کاهش پیدا می‌کند. در این ارتباط بخاطر اینکه مقادیر آستانه ۰ و ۱ را در داده‌های ورودی به شبکه نداشته باشیم داده‌ها با استفاده از رابطه (۲) که باعث می‌شود داده‌ها بین ۰/۱ و ۰/۹ قرار گیرند معیار سازی شد.

$$y = .8 * \frac{X_i - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} + .1 \quad (2)$$

در این رابطه X_{\min} کوچک‌ترین داده و X_{\max} بزرگ‌ترین داده سری داده‌های می‌باشد. با استفاده از این رابطه داده‌های ورودی بین ۰/۱ و ۰/۹ قرار می‌گیرند.

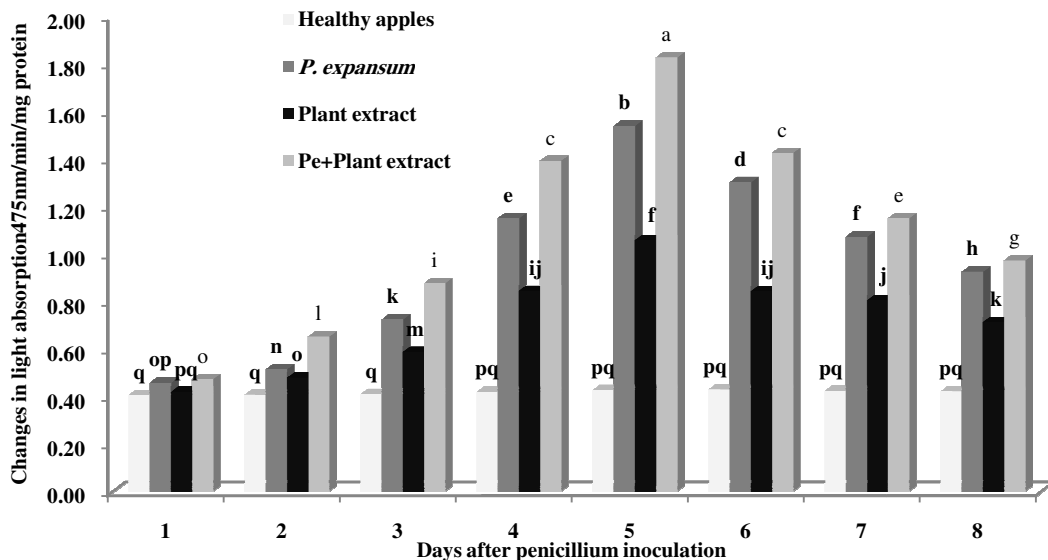
نروفازی: در این روش برای فرآیند آموزش از روش‌های آموزش پس انتشار خطا و کمینه مربعات خطا بهره‌گیری شده و با استفاده از الگوریتم‌های آموزشی شبکه عصبی، بهینه‌سازی پارامترهای توابع عضویت صورت می‌گیرد. هر کدام از توابع عضویت (با تعداد مختلف تابع)، بر اساس مدل با کمترین میزان خطا به روش سعی و خطا آموزش دید. در نهایت تابع عضویت برگزیده خواهد شد. در این پژوهش با استفاده از محیط انفیس‌ادیت^۲ در نرم‌افزار متلب^۳، روش تطبیقی عصبی فازی با هشت نوع تابع عضویت (مثلثی، گوسی، زنگوله‌ای) با تعداد هر تابع بین یک تا نه عدد با روش بهینه‌سازی هیبرید به ترتیب مورد آزمون قرار گرفته و با استفاده از حداقل خطا، بهترین نوع تابع و تعداد آن به دست آمده است.

ارزیابی مدل‌ها: برای بررسی کارایی مدل به منظور میزان فعالیت آنزیم، اعتبارسنجی به روش حذف یک داده و پیش‌بینی آن انجام گرفت. در شرایطی که زمان و بودجه کافی برای برداشت نمونه احتمالی وجود ندارد، بهترین گزینه اعتبارسنجی به روش حذف داده است (Brus et al., 2011). برخلاف روش تقسیم داده‌ها، در این روش تقسیم کردن به طور تکرارپذیری انجام می‌شود که این روش را مؤثرتر

^۲-Anfisedit
^۳-MATLAB

هفتم و هشتم نیز این روند کاهشی مانند روز ششم ادامه پیدا کرد (شکل ۱).

دیگر معنی دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در همه تیمار به غیر از شاهد سالم در این روز مشاهده شد. در روز ششم فعالیت آنزیم نسبت به روز قبل از خود کمتر شد. در روز



شکل ۱- تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در میوه سیب در اثر مایه زنی با قارچ *Penicillium expansum* و عصاره گیاه اسطوخودوس

Fig. 1. Changes in the activity of peroxidase (POX) in inoculated apple fruit with *Penicillium expansum* and lavender extract

رگرسیونی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند. نتایج تجزیه واریانس نیز از معنادار بودن در سطح ۰/۰۵ معادلات برازش داده شده حکایت دارد ($p < 0.05$).

$$POX_t = 0.12 + 0.71 \times POX_{t-1} \quad (6)$$

$$POX_t = 0.43 + 0.61 \times POX_{t-1} \quad (7)$$

$$POX_t = 0.35 + 0.56 \times POX_{t-1} \quad (8)$$

$$POX_t = 0.56 + 0.56 \times POX_{t-1} \quad (9)$$

شبکه عصبی مصنوعی: در ابتدا داده‌های ورودی به شبکه، باید استانداردسازی گردد. در صورتی که داده‌ها به صورت خام وارد شبکه شود، به علت تغییرات زیاد داده‌ها، تأثیر متفاوتی بر روی شبکه گذاشته، به طوری که برخی از نرون‌ها خیلی زود به حد آتش رسیده، در حالی که برخی دیگر از نرون‌ها حتی به آستانه فعالیت نیز نرسیده‌اند (Amini et al., 2005). ساختار بهینه شبکه و همچنین تعداد تکرار یا اپوک به روش سعی و خطا با استفاده از معیارهای ریشه مربعات خطا

پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز:

رگرسیون چند متغیره خطی: برای تعیین رگرسیون چندمتغیره خطی میزان فعالیت آنزیم در روزهای مختلف (شاهد، بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) رابطه رگرسیونی مربوطه به صورت روابط (۶) تا (۹) برای ۴ تیمار بدست آمد. همانطوری که ملاحظه می‌شود نتایج ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۰۰۴ و ۰/۷۰ برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم در شرایط شاهد و در شرایط بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۵۳، ۰/۱۳ و ۰/۴۶ و ۰/۳۳ و ۰/۴۵ بدست آمد (جدول ۱). کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل رگرسیونی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل

برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و ۰/۲۰ و ۰/۷۰ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار تیمار عصاره گیاهی + بیمارگر *P. expansum* بدست آمد. کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند.

و ضریب تبیین تعیین گردید. حداقل مقدار ریشه مربعات خطا در تیمار شاهد مربوط به شبکه با پنج نرون در لایه مخفی و تعداد تکرار ۸۰۰ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای دیگر (بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) به ترتیب مربوط به شبکه با ۸، ۷ و ۴ نرون در لایه مخفی و تعداد تکرار ۵۰۰، ۴۵۰ و ۷۸۰ می‌باشد. نتایج خطای این روش بر اساس مقدار ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۰۰۱ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، ۰/۱۴ و ۰/۷۱ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر *P. expansum*، ۰/۰۹ و ۰/۷۵

جدول ۱- مقایسه نتایج بدست آمده از مدل رگرسیون چندگانه خطی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)

Table 1. Compare the results of multiple linear regression model to predict the enzyme activity

R ²	RMSE	ME	تیمار Treatment
0.70	0.004	0.009	شاهد Control
0.53	0.22	0.21	<i>P. expansum</i>
0.46	0.13	0.17	عصاره گیاهی Plant extract
0.45	0.33	0.28	عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen

RMSE: Root Mean Square Error

ME: Mean Error

R²: Coefficient of Determination

جدول ۲- مقایسه نتایج بدست آمده از مدل شبکه عصبی مصنوعی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

Table 2. Compare the results of artificial neural network to predict the enzyme activity

R ²	RMSE	ME	تیمار Treatment
0.85	0.001	0.002	شاهد Control
0.71	0.14	0.13	<i>P. expansum</i>
0.75	0.09	0.11	عصاره گیاهی Plant extract
0.70	0.20	0.17	عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen

RMSE: Root Mean Square Error

ME: Mean Error

R²: Coefficient of Determination

اساس مقدار ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۸۹ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، ۰/۱۱ و ۰/۷۹ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر *P. expansum*، ۰/۰۵ و ۰/۷۸ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و ۰/۱۴ و ۰/۷۵ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و بیمارگر به صورت توأم *P. expansum* بدست آمد (جدول ۴). کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار عصاره گیاهی و بیمارگر به صورت *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند.

مدل نروفازی: برای ایجاد این شبکه باید چند پارامتر بهینه شوند که شامل نوع تابع عضویت، تعداد تابع و روش یادگیری و تعداد اپوک (Epoch) می‌باشد. برای این کار تمام حالات بوسیله سعی و خطا بدست آمد، که نتایج خصوصیات مدل نروفازی به کار رفته برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای مختلف در جدول (۳) نشان داده شده است. بهترین ساختار با توجه به معیار ریشه مربعات خطا تعیین گردید. به عنوان مثال بهترین نوع تابع، تابع گوسی انتخاب گردید. حداقل مقدار ریشه مربعات خطا در تیمار شاهد مربوط به مدل نروفازی با ۳ تابع عضویت و ۸۰ تکرار، برای میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای دیگر (بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) به ترتیب مربوط به شبکه با ۴، ۳ و ۴ تابع عضویت و ۱۵۰ تکرار می‌باشد. نتایج خطای این روش بر

جدول ۳- ویژگی‌های مدل نروفازی انتخابی برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

Table 3. The features of neuro-fuzzy model to predict the amount of enzyme activity

تیمار Treatment	تعداد توابع عضویت	تکرار	نوع تابع عضویت	روش یادگیری	روش دفازی کردن
شاهد Control	3	80	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
<i>P. expansum</i>	4	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
عصاره گیاهی Plant extract	3	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen	4	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average

جدول ۴- ارزیابی معیارهای خطا مدل نروفازی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

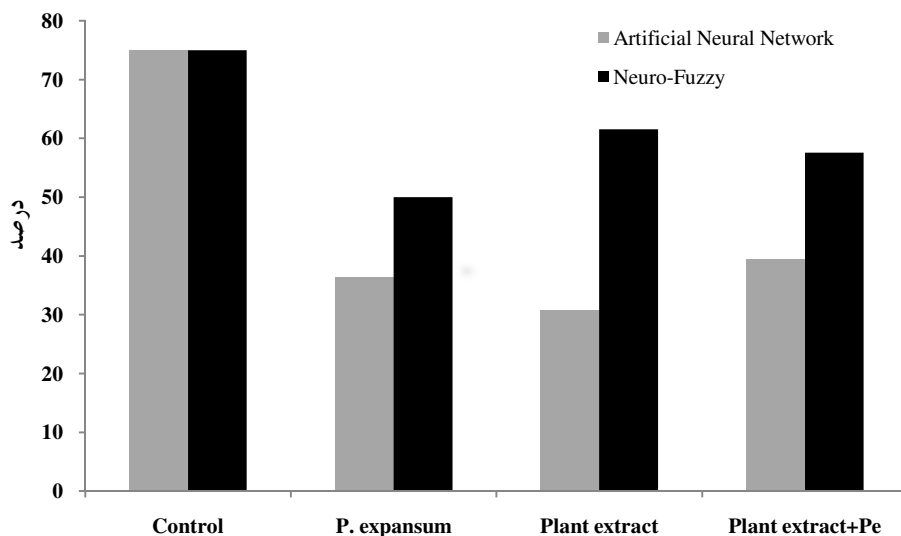
Table 4. Evaluation of error criteria for ANFIS model on prediction of enzyme activity

تیمار Treatment	nRMSE	RMSE	R ²
شاهد Control	0.002	0.001	0.89
<i>P. expansum</i>	0.10	0.11	0.79
عصاره گیاهی Plant extract	0.06	0.05	0.78
عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen	0.11	0.14	0.75

RMSE: Root Mean Square Error
R²: Coefficient of Determination

میزان کاهش خطا در مدل‌های نروفازی و شبکه عصبی نسبت به روش رگرسیون (بدترین مدل در این پژوهش) می‌باشد. به عنوان مثال، مدل نروفازی و شبکه عصبی مصنوعی دقت پیش‌بینی را نسبت به روش رگرسیون خطی چندگانه برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد ۷۵ و ۷۵ درصد، برای تیمار بیمارگر *P. expansum* به میزان ۵۰ و ۳۶ درصد، برای تیمار عصاره گیاهی به میزان ۶۱ و ۳۰ درصد و برای تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* به میزان ۵۷ و ۳۹ درصد، افزایش داده است.

ارزیابی مدل‌ها: نتایج مربوط به نروفازی، شبکه عصبی و رگرسیون چندگانه خطی مربوط به میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده در جداول (۱، ۲ و ۴) آمده است. با توجه به این جداول بهترین عملکرد برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم مربوط به مدل نروفازی می‌باشد و از لحاظ هر سه معیار بهتر از دو مدل شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون چندگانه خطی است. بعد از مدل نروفازی، شبکه عصبی بهترین عملکرد را به خود اختصاص داده است. همچنین از شاخص بهبود نسبی برای ارزیابی کارایی مدل‌ها استفاده شد (شکل ۲). این آماره



شکل ۲- شاخص بهبود نسبی مدل‌ها نسبت به مدل رگرسیون خطی در پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم در چهار تیمار
Fig. 2. Index relative improvement of linear regression models to predict the enzyme activity in four treatments

پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلی‌میراسیون لیگنین که باعث محکم شدن دیواره سلولی می‌شود، جلوگیری کند، در نتیجه سدهای مکانیکی افزایش یافته و سرعت نفوذ عامل بیماری زا کاهش می‌یابد و به سلول‌های گیاه اجازه می‌دهد که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد تنظیم کند (Durner et al., 1997).

ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ساعات اولیه بعد از آلوده‌سازی به وسیله

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره گیاهی اسطوخودوس می‌تواند به عنوان یک محرک مناسب در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز عمل کند، و به عنوان یک ماده محرک فعالیت‌های دفاعی باشد. از نتایج این آزمون چنین استنباط می‌شود که فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه‌های آلوده تیمار شده با عصاره گیاه اسطوخودوس نسبت به شاهد مایه زنی شده با آب مقطر سترون افزایش داشته است. پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که غلظت H_2O_2 را تنظیم می‌کنند (Barcelo, 1997). دی‌گارا و همکاران (De Gara et al., 2003) نشان دادند که H_2O_2 می‌تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت از طریق تسهیل و کاتالیز کردن واکنش‌های

فعالیت آنزیم‌ها در زمان تنش نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرها را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می‌سازد. در واقع زمانی که بتوان فعالیت آنزیم‌ها را با استفاده از داده‌های یک روز برای ۲۴ ساعت آینده بدون اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم در روز بعد پیش‌بینی کرد، از طریق آن به وجود ارقام مقاوم و غیرمقاوم پی می‌بریم و به این وسیله در زمان و وقت صرفه جویی خواهیم کرد. روش‌های مختلفی جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم در سلول‌های گیاهی از جمله سیب وجود دارد، که از جمله آن‌ها می‌توان به رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی اشاره کرد. در کل مدل شبکه عصبی دارای دقت بالاتری نسبت به رگرسیون چندگانه خطی است زیرا ممکن است از یک طرف کارایی توابع انتقالی بدست آمده در مناطق مختلف با هم تفاوت داشته و از طرف دیگر طبق نظر (Schaap et al., 1998) که بر اساس پژوهشی با عنوان مدل‌سازی فازی و بهینه‌سازی تولید لیپاز توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* حاصل شد، و در آن از روش‌های پاسخ سطحی (RSM) و طرح کامپوزیت مرکزی (CCD) استفاده شد، و مهم‌ترین هدف آن مطالعه به کار بردن RSM و GA برای بهینه‌سازی تولید لیپاز و مدل‌سازی تولید آنزیم لیپاز با استفاده از شبکه عصبی و روش‌های نروفازی بود، نشان داد که با استفاده از شبکه عصبی و نروفازی می‌توان پیش‌بینی دقیقی از تولید لیپاز داشت (Padmavathi, 2013).

در طراحی شبکه‌های عصبی نوع خاصی از معادلات لازم نبوده و با ایجاد رابطه مناسب بین داده‌های ورودی و خروجی می‌توان به نتایج مناسب دست یافت و به علت وجود روابط غیرخطی بین متغیرهای وابسته و پیش‌بینی شونده، شبکه عصبی عملکرد بهتری نسبت به مدل‌های رگرسیون داشته است. نتایج محققین مختلف کارایی بالاتر شبکه عصبی مصنوعی را نسبت به سایر توابع خطی تایید کرده‌اند

بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* بررسی شده و نتایج آن نشان داده که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیلایز در دو رقم حساس و مقاوم گندم به‌وسیله سالیسیلیک اسید در حضور و عدم حضور بیمارگر افزایش پیدا می‌کند (Gholamnezhad et al., 2016). اثر عصاره برگ کرفس نیز در القای مقاومت علیه سفیدک پودری خیار بررسی شده و مشخص شده کاربرد عصاره کرفس باعث القای سیستم دفاع گیاهی در گیاه خیار نسبت به بیماری سفیدک پودری می‌شود (Sirous and Jamali, 2014).

کارایی پایین روش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی مقاومت سویه‌های عامل بیماری در برابر قارچکش‌ها، به همراه مشکلات زیست‌محیطی و هزینه‌های ناشی از مصرف سموم موجب شده که بیشترین توجه محققین به سمت استفاده از ارقام مقاوم معطوف شود و این روش به عنوان بهترین روش کنترل بیماری مطرح گردد. (Gholamnezhad et al., 2016). یکی از بهترین راه‌های دسترسی به ارقام مقاوم شناسایی سریع آنها است. با حمله بیمارگرها به گیاه سامانه‌های دفاعی گیاه فعال شده و بعد از افزایش بیان ژن‌های دفاعی، پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که در ارتباط با فعالیت دفاعی گیاه هستند، مقدارشان افزایش پیدا می‌کند. میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاه، و محصولات پروتئینی آن‌ها به عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی SAR (Systemic Acquired Resistance) در گیاهان مختلف و علیه بسیاری از بیمارگرها انجام شده است (Gholamnezhad et al., 2016). در گیاهان حساس و مقاوم هر دو میزان آنزیم‌های مرتبط با فعالیت‌های دفاعی افزایش پیدا می‌کند، ولی میزان این افزایش در رقم مقاوم بسیار زودتر از رقم حساس اتفاق می‌افتد، به عبارت دیگر زمانی که بیمارگر به گیاه حمله می‌کند اگر مقدار آنزیم در همان ساعات اولیه پس از تهاجم افزایش پیدا نکند، گیاه نمی‌تواند به بیماری مقاومت نشان بدهد و بیمارگر آن را از بین خواهد برد. بررسی و پیش‌بینی

در برآورد میزان فعالیت آنزیم بود. مقدار ریشه مربعات خطای محاسبه شده مدل نروفازی در مورد تمام تیمارها کمتر از شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون بود که نشان دهنده دقت بالاتر این مدل در مقایسه با سایر مدل‌ها بود.

مدل‌های پیش بینی که در این تحقیق برای پیش بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز به کار رفتند هر سه توانستند به میزان قابل قبولی میزان فعالیت آنزیم را در ۲۴ ساعت آینده پیش‌بینی کنند. نظر به نیاز به این چنین اطلاعاتی از سامانه دفاعی گیاه، استفاده بیش از پیش این مدل‌ها در پیش بینی فعالیت آنزیم‌ها و همچنین ژن‌های دفاعی و سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی که در ارتباط با دفاع گیاهی است، می‌تواند راه‌گشای محققین اصلاح نباتات و همچنین بیماری‌شناسی در جهت تولید و اصلاح گیاهان تراریخته باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که تحقیقاتی از این دست با تعداد بیشتری داده در مورد هر آنزیم و همچنین با تعداد بیشتری آنزیم صورت گیرد، و همچنین پیشنهاد می‌شود آنزیم‌هایی را استفاده کرد که در مسیرهای متنوع فیزیولوژیکی شرکت دارند و با استفاده از اطلاعات حاصل از این پیش بینی‌ها مسیریایی که در سیستم‌های بیولوژیکی فعال هستند، با یکدیگر ارتباط داد. همچنین نتایج نشان داد که مدل نروفازی دارای کارایی بالاتری جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سایر مدل‌ها است.

(Taghizadeh Mehrjardi et al., 2013).

تمامی این روش‌ها بر پایه فرض دقیق بودن متغیرهای مورد مطالعه و مشاهدات مربوط به آن‌ها استوار است و روابط بین متغیرها نیز دقیق فرض شده‌است. در حالی که در سیستم‌های زیستی مثل فعالیت آنزیم‌ها، معمولاً مشاهدات یا روابط ناشناخته‌ای بین متغیرها وجود دارد، در چنین شرایطی از مدل‌هایی می‌توان بهره گرفت که قادر به ارائه الگوهای مناسب‌تری از روابط بین متغیرها باشند، به گونه‌ای که این مدل‌ها بتوانند انطباق بیشتری با دنیای واقعی داشته باشند. بدین ترتیب با توجه به ماهیت ابهام‌دار پدیده‌های مرتبط با عوامل بیماری‌زا و میزان فعالیت آنزیم با تقریبی بودن مقادیر اندازه‌گیری شده میزان فعالیت آنزیم، به نظر می‌رسد کارایی بالاتر مدل مبتنی بر مجموعه‌های فازی در پیش‌بینی فعالیت آنزیم به همین علت باشد (Mohammadi, 2007). محققین نتیجه گرفتند که روش رگرسیون فازی در شرایطی که روابط ابهام‌دار بین متغیرها و به طور کلی در مواردی که با خطاهای ناشی از ابهام در ساختار معادلات رگرسیونی مطرح است، می‌تواند مکمل و جایگزین مناسبی برای روش رگرسیون آماری تلقی شود (Mohammadi and Taheri, 2005). در این تحقیق نیز نتایج مشابهی بدست آمد. به طوری که شبکه عصبی مصنوعی در مقایسه با نروفازی دارای کارایی کمتری

References

- ABDULAZIZ, A., Y. AL-ASKAR and M. RASHAD, 2010. Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on Pea. *Journal of Plant Protection Research*, 50 (3): 239-243.
- AMINI, M., K. C. ABBASPOUR, H. KHADEMI, N. FATHIANPOUR, M. AFYUNI and R. SCHULIN, 2005. Neural network models to prediction exchange capacity in arid regions of Iran. *European Journal of Soil Science*, 53: 748-757.
- AZIMI, A. A., H. B. DELNAVAZ and G. A. MANSOUR, 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicolor against *Fusarium solani*, *Fusarium poa* in Persian. *Journal of Medicinal Plants*, 6 (1): 26 - 32.
- BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK and M. IDAOMAR, 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chemistry Toxicology*, 46: 446-475.
- BARCELO, A. R. 1997. Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology*, 176: 87-132.
- BATTA, Y. A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifia formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. *Food Microbiology*, 96: 281- 288.
- BRADFORD, M. M. 1967. A rapid sensitive method for the

- quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BRUS, D. J., KEMPEN, B. and G. B. M. HEUVLINK, 2011. Sampling for validation of digital soil maps. *European Journal of Soil Science*, 62: 394-407.
- DAAYF, F., A. SCHMITT and R. R. BELANGER 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology*, 113: 719 – 727.
- DE GARA, L., M. C. DE PINTO and F. TOMMASI, 2003. The antioxidant systems visavis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 863–870.
- DURNER, J., J. SHAH and D. F. KLESSIG, 1997. Salicylic acid and disease in plants. *Trends in Plant Science*, 2: 266–274.
- ETEBARIAN, H. R., P. L. SHOLBERG, K. C. EASTWELL, and R. J. SAYLER, 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 51: 591-598.
- GHOLAMNEJAD, J., H. R. ETEBARIAN, A. ROUSTAEI, and N. A. SAHEBANI, 2009. Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Protection Research*, 49: 270-275.
- GHOLAMNEZHAD, J., F. SANJARIAN, E. M. GOLTAPPEH, N. SAFAEI and K. RAZAVI, 2016. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with of salicylic acid *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Sciences*, 47: 1-8.
- GONG, Y., P. M. A. TOIVONEN, O. L. LAU and P. A. WIERSMA., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder. *Academia Sinica Taipei Journal*, 42: 259-264.
- HAN, J., M. KAMBER and J. PEI, 2011. *Data mining: concepts and techniques*. Elsevier.
- HERGER, G., F. D. KLINGAUF, E. H. MANGOLD, P. POMMER and M. SCHERER, 1988. Efficacy of extracts of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai against fungal diseases, especially powdery mildews. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 40(4): 56 – 60.
- JANISIEWICZ, W. J. and L. KORESTENT, 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 411-441.
- JAVADZARIN, I. and B. MOTESHARE ZADEH, 2016. Evaluation of multivariate regression models and artificial neural network to predict the activity of antioxidant enzymes in wheat shoots (*Triticum aestivum*) under cadmium toxicity. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 46: 727-737. (In Persian)
- MOHAMMADI, J. 2007. Testing an artificial neural network for predicting soil water retention characteristics from soil physical and chemical properties. 17th World Congress of Soil Science, Thailand, Paper No 221.
- MOHAMMADI J. and M. TAHERI, 2005. Estimation of pedotransfer function using fuzzy regression. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 2: 51-60. (In Persian)
- PADMAVATHI, M. 2013. Fuzzy modeling and optimization of lipase production using *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Current Biotechnology*, 2(1):1-6.
- SCHAAP, M. G., F. J. LEIJ and M. T. VAN GENUCHTEN, 1998. Neural network analysis for hierarchical prediction of soil hydraulic properties. *Journal of Soil Science Society of America*, 62: 847-855.
- SIROUS, A. and A. H. JAMALI ZAVAREH, 2014. Effectiveness of celery leaf extraction the induction of resistance against cucumber powdery mildew, 50(2): 151-161.
- TAGHIZADEH MEHRJARDI, R., F. SARMADIAN, G. R. SAVAGHEBI, M. OMID, N. TOMANIAN, M. G. ROUSTA and M. H. RAHIMIAN, 2013. Comparison of fuzzy techniques, genetic algorithms, neural networks and multivariate regression prediction of soil salinity (Case study: Ardekan city). *Journal of Range and Watershed Management*, 66: 207-222. (In Persian).