



Research Article

Investigation of Alternative Splicing in Florpyrauxifen-benzyl Herbicide-Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Rice FieldsBehrouz Khalil Tahmasebi¹, Ali Abbasi^{1*}, Mohammad Roozkhosh², Fatemeh Faryabi³¹ Department of Plant Protection, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran.² PhD Graduate in Weed Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.³ PhD Student in Agroecology, Jiroft Branch, Islamic Azad University, Jiroft, Iran.

Article Info

Received:

December 06, 2025

Accepted:

June 08, 2026

First published online:

June 22, 2026

Corresponding Author:

Ali Abbasi

Email:

Ali.abasi87@gmail.com

Key words:

Amino acid metabolism,
Gene ontology analysis,
Secondary metabolite
biosynthesis,
Non-target site resistance
(NTSR).

Abstract

Alternative splicing (AS) was investigated as a key mechanism in non-target-site resistance (NTSR) to the herbicide florpyrauxifen-benzyl in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* [L.] Beauv.). Utilizing advanced transcriptomic analyses of RNA-Seq data processed through CLC Genomics Workbench (2023) and Python (version 3.12) in resistant and susceptible populations, 24 genes with unique AS patterns were identified in the resistant population. The absence of these AS events in the susceptible population highlights their pivotal role in resistance. Results demonstrated that the frequency of all AS event types, particularly intron retention and alternative splice site usage (A3'SS and A5'SS), was significantly increased in the resistant population. Convergent enrichment analyses (GO, KEGG, Reactome, InterPro) conclusively revealed that the resistance mechanism is based on enhanced metabolic herbicide detoxification through reprogramming of aromatic amino acid (tyrosine and phenylalanine) metabolism and secondary metabolite biosynthesis pathways. Highly significant enrichment of pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase protein domains confirmed the role of alternative isoforms of conjugation enzymes in herbicide inactivation. Furthermore, a complex regulatory network between AS-affected genes and miRNAs uncovered a precise post-transcriptional regulatory layer. This study provides the first evidence for the pivotal role of alternative splicing in resistance to synthetic auxin herbicides and paves the way for developing novel management strategies.

Cite this article: Khalil Tahmasebi, B., Abbasi, A., Roozkhosh, M., Faryabi, F. (2026). Investigation of alternative splicing in florpyrauxifen-benzyl herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice fields. *Iran. J. Weed Sci.* 22(1): 14-38. DOI: [10.22034/ijws.2026.370951.1497](https://doi.org/10.22034/ijws.2026.370951.1497)





مقاله پژوهشی

نقش پیرایش جایگزین (Alternative Splicing) در علف هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) مقاوم به علف کش فلوپیراکسیفن-بنزیل در محصول برنج

بهروز خلیل طهماسبی^۱، علی عباسی^{۱*}، محمد روزخ، فاطمه فاریابی^۲

^۱ بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران.

^۲ دانش آموخته دکتری علوم علف های هرز، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ دانشجوی دکتری اگرواکولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جیرفت، جیرفت، ایران.

چکیده

پدیده پیرایش جایگزین (AS) به عنوان یک مکانیسم کلیدی در ایجاد مقاومت در محل غیرهدف (NTSR) به علف کش فلورپیراکسیفن-بنزیل در علف هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های پیشرفته رونویسی بر روی داده‌های RNA-Seq پردازش شده از طریق کتابخانه‌های (2023) CLC Genomics workbench و پایتون نسخه (۳.۱۲) در جمعیت‌های مقاوم و حساس، ۲۴ ژن با الگوهای منحصر به فرد AS در جمعیت مقاوم شناسایی شدند که عدم وجود آن‌ها در جمعیت حساس، نقش محوری آن‌ها را در مقاومت نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که فراوانی تمامی انواع رویدادهای مذکور به‌ویژه حفظ اینترون و استفاده از جایگاه‌های اتصال جایگزین (A3'SS و A5'SS) در جمعیت مقاوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. آنالیزهای غنی‌سازی هم‌گرا (GO, KEGG, Reactome, InterPro) به‌طور قاطعانه نشان داد که سازوکار مقاومت، مبتنی بر افزایش سم‌زدایی متابولیسمی علف کش از طریق بازتنظیم مسیرهای متابولیسم اسیدهای آمینه حلقوی (تیروزین و فیل‌آلانین) و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است. غنی‌سازی بسیار معنی‌دار دامنه‌های پروتئینی آمینوترانسفرازهای وابسته به پیریدوکسال فسفات، نقش ایزوفرم‌های جایگزین آنزیم‌های الحاق‌سازی در غیرفعال کردن علف کش را تأیید کرد. همچنین، شبکه تنظیمی پیچیده بین ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین و miRNAها، وجود یک لایه تنظیم پس از رونویسی دقیق را آشکار ساخت. این مطالعه برای اولین بار نقش محوری پیرایش جایگزین را در مقاومت به علف کش‌های شبه‌اکسین نشان می‌دهد و زمینه را برای توسعه راهکارهای مدیریتی جدید فراهم می‌کند.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت:

۱۴۰۴/۰۹/۱۵

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۵/۰۳/۱۸

تاریخ انتشار برخط:

۱۴۰۵/۰۴/۰۱

نویسنده مسئول:

علی عباسی

ایمیل:

Ali.abasi87@gmail.com

واژه‌های کلیدی:

آنالیز غنی‌سازی هم‌گرا،
بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه،
متابولیسم اسیدهای آمینه،
مقاومت غیرمحل هدف.

استناد: خلیل طهماسبی، بهروز؛ عباسی، علی؛ روزخ، محمد؛ فاریابی، فاطمه (۱۴۰۵). نقش پیرایش جایگزین (Alternative Splicing) در علف هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) مقاوم به علف کش فلوپیراکسیفن-بنزیل در محصول برنج. *دانش علف‌های هرز ایران*، ۲۲ (۱): ۳۸-۱۴.

DOI: 10.22034/ijws.2026.370951.1497

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان است. © ۱۴۰۵. ناشر این مقاله، انجمن علوم علف‌های هرز ایران و موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور است. این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است.



Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

مقدمه

خسارت‌های اقتصادی ناشی از حضور علف‌های‌هرز در عرصه تولید محصولات کشاورزی، یکی از چالش‌های پیش‌روی بشر است. براساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد^۱، این خسارات سالانه به بیش از ۹۵ میلیارد دلار در سطح جهان می‌رسد (Guo et al., 2017). جنس *Echinochloa* یا سوروف از تیره Poaceae، شامل حدود ۲۵۰ گونه یکساله و چندساله می‌باشد. سوروف (*Echinochloa crus-galli* [L.] Beauv.) یک گیاه یکساله است که توسط بذر تکثیر می‌شود و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین علف‌های‌هرز باریک‌برگ مشکل‌ساز در بسیاری از گیاهان زراعی به‌خصوص برنج شناخته شده است (Bryson & DeFelice, 2009; Chauhan & Abugho, 2012). تلفات جهانی عملکرد برنج ناشی از رقابت با علف‌های‌هرز سوروف حدود ۳۵ درصد برآورد شده است (Orecke & Dehne, 2004). در طول فصل کشت این علف‌های‌هرز قادر است، حتی در تراکم بسیار پایین زمانی که نسبت گیاه برنج به سوروف ۱۰ به ۱ است، سبب کاهش زیست‌توده (حدود ۷۵ درصد) و همچنین کاهش عملکرد محصول برنج (حدود ۵۰ درصد) شود (He et al., 2012). تاکنون علف‌کشی‌های بسیاری در زراعت برنج برای کنترل سوروف در سرتاسر دنیا به ثبت رسیده است. با این حال، استفاده مکرر از علف‌کشی‌ها به توسعه سریع مقاومت به علف‌کشی منجر می‌گردد (Powles & Yu, 2010; Heap, 2013). مطالعات حاکی از آن

است که علف‌های‌هرز سوروف با تکامل مقاومت محل هدف و غیر محل هدف به یکی از خطرناک‌ترین علف‌های‌هرز مقاوم به علف‌کشی در جهان تبدیل شده است (Norsworthy et al., 2014). به‌طوری که از زمان کشف اولین مورد مقاومت به علف‌کشی در سوروف در سال ۱۹۷۸ (میلند، ایالات متحده آمریکا)، تا سال ۲۰۲۲ تعداد ۴۹ مورد مقاومت به علف‌کشی در این علف‌های‌هرز گزارش شده که از این میان، ۳۷ مورد در مزارع برنج شناسایی شده است (Heap, 2022). در ایران برای اولین بار در سال ۲۰۰۹ مقاومت سوروف گونه (L.) Link (*Echinochloa colona*) به علف‌کشی‌های بازدارنده فتوسیستم II (آترازین) در مزارع نیشکر در استان خوزستان گزارش شد (Elahifard et al., 2013). بررسی‌ها در دو دهه اخیر حاکی از تکامل مقاومت سوروف نسبت به نه گروه علف‌کشی از جمله بازدارنده‌های استولاکتات سینتاز، بازدارنده‌های استیل‌کوآنزیم‌آ-کربوکسیلاز، اکسین مصنوعی، فتوسیستم II، اوردها و آمیدها، دی‌نیتروآنیلین‌ها، تیوکاربامات‌ها، کلرواستامیدها و ایزوکسازولیدینون‌ها در سرتاسر دنیا شده است (Juliano et al., 2010; Heap, 2022).

فلوپیراکسیفن-بنزیل (با نام تجاری Rinskor) یک علف‌کشی از گروه اکسین مصنوعی (گروه O طبقه‌بندی HRAC) با طیف اثر گسترده روی علف‌های‌هرز است که در سال ۲۰۱۷ برای کاربرد در کشور چین به ثبت رسیده است. این علف‌کشی

^۱ FAO

انطباق با شرایط محیطی را فراهم می‌آورد (Syed et al., 2012).

پیرایش جایگزین، فرآیندی است که طی آن، از یک ژن واحد، با انتخاب کنترل‌شده جایگاه‌های اتصال^۲ در طول پردازش RNA پیک^۳، چندین گونه مختلف mRNA بالغ تولید می‌شود. این پدیده شامل انواعی همچون حفظ اینترون^۴ (IR)، حذف اگزون^۵ (ES)، استفاده از جایگاه اتصال^۶ ۵' جایگزین^۶ (A5'SS) و جایگاه اتصال^۷ ۳' جایگزین^۷ (A3'SS) است (Nilsen & Graveley, 2010; Syed et al., 2012). به این ترتیب، پیرایش جایگزین به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های تنظیم پس از رونویسی، نقش حیاتی در انعطاف‌پذیری متابولیک گیاهان ایفا کرده و با تولید ایزوفرم‌های متعدد پروتئینی از یک ژن واحد، ظرفیت کدگذاری ژنوم را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد (Lam et al., 2022; Szakonyi & Duque, 2018). برآوردها نشان می‌دهد که در حدود ۹۵ درصد از ژن‌های چنداگزونی انسان پیرایش جایگزین رخ می‌دهد (Pan et al., 2008)، درحالی‌که این میزان در گیاه آراییدوپسیس حدود ۶۱ درصد گزارش شده است (Marquez et al., 2012). به طور مشخص‌تر، حداقل ۴۲ درصد از ژن‌های دارای اینترون در آراییدوپسیس و ۴۸ درصد در برنج تحت تأثیر پیرایش جایگزین قرار می‌گیرند که حفظ اینترون

پس‌رویشی از طبقه جدید متیل استرهای آرل-پیریدین است که توسط شرکت داو آگروساینس توسعه یافته و در تولید برنج مورد استفاده قرار می‌گیرد. علف‌کش‌های اکسین مصنوعی اساساً با تقلید از مقادیر بیش‌ازحد اکسین طبیعی (ایندول-۳-استیک اسید (IAA))، هموستازی هورمون‌های درون‌زاد گیاه را مختل کرده و موجب اختلال شدید در رشد و توسعه گیاه می‌گردند، که در نهایت به مرگ گیاه منجر می‌شود (Grossmann, 2000). با این حال، سازوکار عمل دقیق علف‌کش‌های اکسین مصنوعی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. افزایش تکامل مقاومت سوروف به علف‌کش‌ها، تولید برنج را به شدت تهدید نموده، لذا لازم است راهبردهای مدیریتی جایگزین برای مدیریت این گیاه مشکل‌ساز در زراعت برنج در نظر گرفته شود. بنابراین، درک مکانیسم‌های مولکولی بنیادین که در توسعه مقاومت به علف‌کش دخیل است، برای به حداقل رساندن و مدیریت توسعه مقاومت و افزایش عملکرد محصول ضروری است (Powles & Yu, 2010; Heap, 2013). در این میان، پدیده‌ی پیرایش جایگزین^۱ یا AS، به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های محیطی، می‌تواند نقش کلیدی در ایجاد مقاومت به علف‌کش ایفا نماید (Filichkin et al., 2015). این فرآیند با تولید ایزوفرم‌های مختلف پروتئینی از یک ژن واحد، امکان ایجاد تنوع عملکردی سریع و

¹ Alternative Splicing

² Splice Sites

³ Pre-mRNA

⁴ Intron Retention

⁵ Exon Skipping

⁶ Alternative 5' Splice Site

⁷ Alternative 3' Splice Site

شایع‌ترین نوع این رویدادها در گیاهان است (Filichkin et al., 2010; Lam et al., 2022).

پیرایش جایگزین با افزایش انعطاف‌پذیری رونوشتوم^۱، به تنوع گسترده در پروتئوم می‌انجامد. این فرآیند در گیاهان می‌تواند به صورت اختصاصی در مراحل گوناگون رشد، انواع بافت‌ها و تحت شرایط مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله تنش‌های دمایی، شوری، خشکی و آلودگی‌های بیماری‌زا رخ دهد (Filichkin et al., 2010; Wang & Zhou, 2013; Zheng et al., 2017). رونوشت‌های حاصل از AS ممکن است به پروتئین‌هایی ترجمه شوند که از نظر ویژگی‌های عملکردی از جمله ساختار، جایگاه زیرسولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین با یکدیگر تفاوت دارند (Laloum et al., 2017; Lam et al., 2022; Lee et al., 2021). به عنوان مثال، مطالعات متعدد نقش پیرایش جایگزین را در تنظیم متابولیسم نشاسته، لیپیدها، اسکوربات، هورمون‌های گیاهی و طیف وسیعی از متابولیت‌های تخصصی از جمله ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به اثبات رسانده‌اند (Lam et al., 2022). باوجود پیشرفت‌های قابل توجه در شناسایی ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین در مسیرهای متابولیسمی مختلف، نقش دقیق این پدیده در ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها به ویژه در علف‌های هرز، همچنان ناشناخته باقی مانده است. عناصر توالی خاص در pre-mRNAها و همچنین برهم‌کنش‌های پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA،

پیرایش جایگزین را در انواع سلول‌ها و شرایط محیطی مختلف تنظیم می‌کنند (Syed et al., 2012). به این ترتیب، پیرایش جایگزین نقش کلیدی در تنظیم سازگاری محیطی گیاهان ایفا می‌کند (Shang et al., 2017). جالب است که برخی از ایزوفرم‌های پروتئینی حاصل از پیرایش جایگزین، می‌توانند به صورت مهاری غالب با عملکرد ایزوفرم‌های متعارف تداخل ایجاد کنند (Liu et al., 2018). تأثیر پیرایش جایگزین بر رونوشت‌های ژن‌های مقاومت و در نتیجه، تغییر در پاسخ‌های دفاعی گیاه از طریق تولید ایزوفرم‌های پروتئینی مختلف، در مطالعات متعددی به ثبت رسیده است (Li & Howe, 2001). همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد پیرایش جایگزین می‌تواند تحت تأثیر فعالیت القایی RNAهای کوچک تداخلی ثانویه فازدار و مسیرهای ایمنی در گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی، در پاسخ به آلودگی با ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی قرار گیرد (Zheng et al., 2017).

باتوجه به اهمیت روزافزون پدیده پیرایش جایگزین در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی و فقدان مطالعات جامع در این زمینه در علف‌های هرز، هدف از این پژوهش بررسی الگوهای پیرایش جایگزین در علف هرز سوروف مقاوم به علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل و شناسایی ایزوفرم‌های ژنی مرتبط با مکانیسم‌های مقاومت است. این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز توسعه راهکارهای جدید مدیریتی

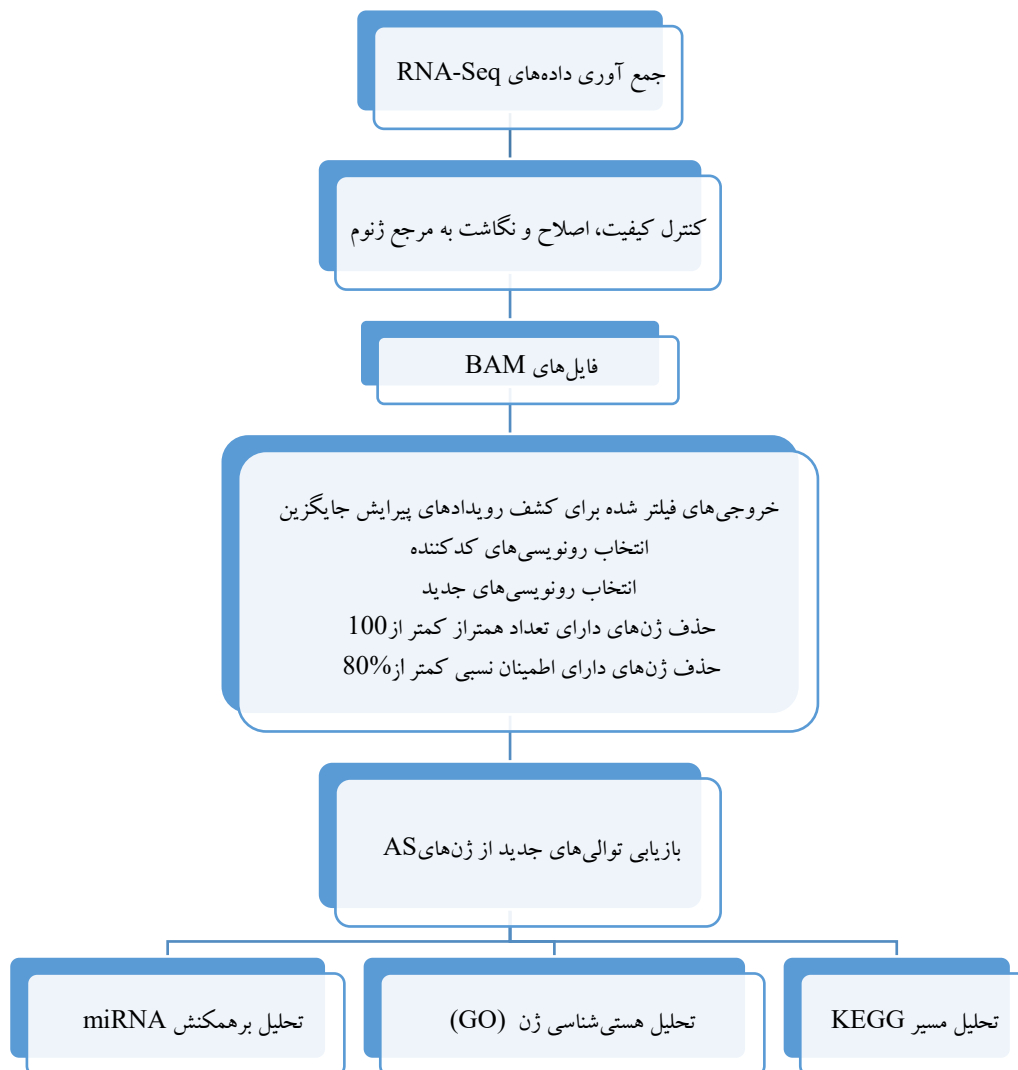
^۱ Transcriptome

۸۹/۱۱ طی آزمایشات گلخانه‌ای شناسایی شد. به‌منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی این مقاومت، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۳ انجام شد، تغییرات بیان ژن‌های مسیرهای هورمونی در بیوتیپ‌های مقاوم و حساس ۲۴ ساعت پس از تیمار با علف‌کش با استفاده از فناوری ترانسکریپتومیکس مقایسه گردید. مسیر انجام این مطالعه به‌صورت فلوچارت نشان داده شده است (شکل ۱).

برای کنترل این علف‌هرز و درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به علف‌کش باشد.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد استفاده در این مقاله براساس مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۱۷ در چین انجام شده است، که در آن مطالعه یک بیوتیپ مقاوم سوروف (*Echinochloa crus-galli* (L.) Link) در برابر علف‌کش فلورپیراکسیفن-بنزیل با شاخص مقاومت



شکل ۱. فلوچارت مراحل تحلیل داده‌های RNA-Sequencing برای کشف وقایع پیرایش جایگزین

Figure 1. Flowchart of the RNA-Sequencing data analysis pipeline for the discovery of Alternative Splicing events

۱. جمع‌آوری داده‌های توالی‌یابی^۱ RNA-seq

داده‌های خام توالی‌یابی^۲ RNA مورد استفاده در این مطالعه که مربوط به دو جمعیت علف هرز سوروف (*E. crus-galli*) شامل یک جمعیت مقاوم (R) و یک جمعیت حساس (S) به علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل از پایگاه داده‌های توالی‌یابی NCBI Sequence Read Archive (SRA) باز یابی شد. این داده‌ها تحت شماره دسترسی (*BioProject* PRJNA938437) قابل دسترسی هستند و توسط جین و همکاران (Jin et al. 2023) منتشر شده‌اند.

در مطالعه مذکور، شرایط رشد گیاهان، روش‌های اعمال تیمار علف‌کش، و پروتکل‌های استخراج RNA به‌طور مفصل شرح داده شده است. به‌طور خلاصه، از بافت برگ گیاهان هر دو جمعیت در زمان‌های مشخص پس از تیمار با دز توصیه‌شده علف‌کش، نمونه‌برداری و RNA کل با استفاده از کیت تجاری (QIAGEN, Germany) استخراج شد.

با توجه به نیازهای پژوهشی حاضر، فایل‌های FASTQ مربوط به هر نمونه (شامل تکرارهای زیستی) از پایگاه داده SRA با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench نسخه ۲۰۲۵.۰.۱ باز یابی (CLC Genomics Workbench, 2023) شد. کلیه داده‌های مورد استفاده در این تحلیل، منحصراً از یک آزمایش واحد که تحت شرایط کنترل‌شده اجرا شده بود، استخراج شد تا یکنواختی نمونه‌ها و قابلیت

مقایسه‌پذیری نتایج تضمین شود. تمرکز اصلی این تحلیل مجدد، بر شناسایی الگوهای پیرایش جایگزین (*AS*) و انجام تحلیل‌های پایین‌دستی^۳ معطوف شد، که در مطالعه اولیه به آن پرداخته نشده بود.

۲. آنالیزهای بیوانفورماتیکی

۲-۱. توالی ژنوم مرجع و فایل حاشیه‌نویسی^۴ علف هرز سوروف از پایگاه داده^۵ Ensembl Plants استخراج شد (Howe et al., 2021).

توالی ژنوم به صورت فایل FASTA و اطلاعات حاشیه‌نویسی ژن‌ها (شامل مکان اگزون‌ها، اینترون‌ها و توالی رونوشت‌ها) به قالب استاندارد GTF/GFF3 از این پایگاه داده بارگیری شد. این ژنوم به‌عنوان مرجع برای هم‌ترازی خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) و همچنین، شناسایی و کمی‌سازی رویدادهای پیرایش جایگزین مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی که ژنوم این گیاه به‌خوبی توالی‌یابی و مونتاژ شده و توسط کنسرسيوم Ensembl به‌طور منظم به‌روزرسانی می‌شود، به‌عنوان یک مرجع قابل اعتماد برای تحلیل‌های ترانسکریپتومی در نظر گرفته شد.

۲-۲. پردازش اولیه داده‌های خام توالی‌یابی فایل‌های FASTQ با استفاده از نرم‌افزار تجاری CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۵.۰.۱، Qiagen, Germany) انجام شد. کنترل کیفیت خوانش‌ها با استفاده از ابزار داخلی نرم‌افزار صورت پذیرفت. سپس برای حذف نواحی با کیفیت پایین، آداپتورها و

^۱ RNA-Sequencing

^۲ Raw RNA-seq reads

^۳ Downstream Analyses

^۴ Annotation

^۵ https://plants.ensembl.org/Echinochloa_crus_galli/Info/Index

توالی‌های پرایمر، از ابزار Trim Sequences استفاده شد. خوانش‌های اصلاح‌شده^۱ با استفاده از ابزار "Map Reads to Reference" به ژنوم مرجع علف‌هرز سوروف هم‌تراز شدند. پس از هم‌ترازی، از ماژول "RNA-Seq and Small RNA Analysis" در همان نرم‌افزار CLC Genomics Workbench برای انجام آنالیز رونوشت‌ها استفاده شد. آنالیز انجام‌شده شامل کمی‌سازی سطح بیان ژن‌ها بر اساس تعداد خوانش‌های هم‌تراز شده با هر ژن^۲، کشف ایزوفرم‌های رونوشت‌های نوین و شناسایی رویدادهای پیرایش جایگزین بر اساس الگوهای اتصال خوانش‌ها به ژنوم^۳ و تنها رونوشت‌ها و ایزوفرم‌هایی که توسط حداقل ۱۰ خوانش پشتیبانی می‌شدند، بودند. خروجی این مرحله، یک ماتریس کمی از بیان ژن‌ها و یک فهرست از تمامی رونوشت‌های شناسایی‌شده بود که مبنای اصلی برای آنالیزهای بعدی شامل شناسایی تفاوت‌های بیان ژن‌ها و رویدادهای پیرایش جایگزین قرار گرفت (Ghorbani et al., 2019).

باتوجه به حجم بسیار بالای داده‌های توالی‌یابی و تعداد زیاد رویدادهای پیرایش جایگزین شناسایی‌شده اولیه، یک مرحله فیلتر با سخت‌گیری بالا برای افزایش اطمینان و تمرکز روی قابل‌اعتمادترین رویدادها انجام شد. معیار فیلترکردن بر اساس تعیین حداقل تعداد خوانش‌های هم‌تراز شده‌ی منحصر به فردی که به‌طور

مشخص از الگوی اتصال^۴ هر رویداد پیرایش پشتیبانی می‌کنند در نظر گرفته شد. رویدادهای پیرایش تنها در صورتی برای آنالیزهای بعدی حفظ شدند که حداقل دارای ۱۵۰ خوانش پشتیبان^۵ در تمام نمونه‌ها بودند. به‌منظور افزایش دقت و اطمینان از کشف رونوشت‌ها و کاهش رونوشت‌های ناشی از خطا، حداقل طول قاب خوانش باز^۶ برابر با ۲۰۰ جفت‌باز در نظر گرفته شد. این پارامتر بدین معنی است که تنها رونوشت‌هایی که حاوی یک ORF به‌طول حداقل ۲۰۰ جفت‌باز (معادل ۶۷ اسید آمینه) بودند، به‌عنوان رونوشت‌های معتبر و دارای پتانسیل کدکنندگی پروتئین برای تحلیل‌های بعدی حفظ شدند. این آستانه بر اساس مطالعات استاندارد تعیین شد (Kong et al., 2007). خروجی نهایی پردازش داده‌ها و کشف رونوشت‌ها در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench، شامل مجموعه‌ای جامع از عناصر ژنومی و رونوشت‌های از جمله ژن‌های شناخته‌شده^۷ (که شامل ۱) فهرستی از تمامی ژن‌های ازپیش حاشیه‌نویسی‌شده در ژنوم مرجع که در نمونه‌های مورد مطالعه بیان شده بودند، که این خروجی شامل اطلاعاتی همچون شناسه ژن، مکان ژنومی و سطح بیان بود. ۲) ژن‌های پیش‌بینی‌شده نوین^۸ که مجموعه‌ای از ژن‌های جدید که پیش‌تر در حاشیه‌نویسی ژنوم مرجع وجود نداشتند، ولی بر اساس الگوهای هم‌ترازی خوانش‌ها و وجود ORF‌های معنی‌دار شناسایی شدند.

¹Trimmed Reads

²Read Counts

³Junction Reads

⁴Splice Junction

⁵Minimum Spliced Count ≥ 150

⁶Minimum Open Reading Frame (ORF) Length

⁷Known Genes

⁸Novel Predicted Genes

رونوشت‌های در محیط Google Colab

تمامی آنالیزهای پیشرفته ژنومی و رونوشت‌ها با بهره‌گیری از زیرساخت ابری^۵ انجام شد. این پلتفرم، یک محیط محاسباتی مبتنی بر cloud را فراهم می‌آورد که امکان دسترسی به منابع سخت‌افزاری قدرتمند از جمله GPU و TPU و نصب آسان کتابخانه‌های تخصصی را میسر می‌سازد. یک نوت‌بوک^۶ اختصاصی در این محیط ایجاد شد که شامل کدهای پایتون (Python 3.12) و توضیحات گام‌به‌گام بود (Ghorbani et al., 2019).

۳-۲-۱. ترسیم نمودار ون

ترسیم نمودار ون با استفاده از کتابخانه Matplotlib و Matplotlib-venn در محیط Google Colab انجام شد. فهرست نهایی ژن‌های دارای رویدادهای پیرایش جایگزین در هر گروه (مقاوم و حساس) به‌عنوان ورودی به تابع رسم نمودار داده شد و نمودار با تنظیمات مناسب ترسیم شد. برای ترسیم نمودار، از فهرست نهایی ژن‌های دارای رویدادهای پیرایش جایگزین در دو گروه مقاوم و حساس به‌عنوان ورودی استفاده شد و نمودار با اعمال تنظیمات مناسب ترسیم شد (شکل ۲) (Ghorbani et al., 2019).

۳-۲-۲. نمودار توزیع انواع رویدادهای پیرایش جایگزین

نمودار توزیع انواع رویدادهای پیرایش جایگزین در محیط Google Colab و با استفاده از کتابخانه‌های Matplotlib نسخه ۳.۵.۲ و Seaborn نسخه ۰.۱۱.۲

این ژن‌ها با استفاده از پیشوند "Novel_" نام‌گذاری شدند. (۳) رونوشت‌های پیش‌بینی‌شده نوین^۱ که ایزوفرم‌های رونوشت‌های جدیدی که برای ژن‌های شناخته‌شده پیش‌بینی شدند (پیوست ۱). این رونوشت‌ها نشان‌دهنده‌ی انواع جدیدی از پیرایش جایگزین بودند که تاکنون گزارش نشده بودند. (۴) پیرایش جایگزین نواحی کدکننده پروتئین پیش‌بینی شده^۲ که توالی‌های کدکننده پروتئین^۳ که برای هر ترنسکرپت (چه شناخته شده و چه نوین) پیش‌بینی شدند. این پیش‌بینی با در نظر گرفتن چارچوب خوانش باز (ORF) و هم‌ترازی با پایگاه‌های داده پروتئینی انجام پذیرفت، نهایتاً رویدادهای پیرایش جایگزین تأیید شده^۴ که فهرست نهایی رویدادهای پیرایش جایگزین (از جمله حفظ اینترون، حذف اگزون، و استفاده از جایگاه‌های اتصال ۵' و ۳' جایگزین) که پس از اعمال فیلترهای سختگیرانه آماری (از جمله پشتیبانی توسط حداقل ۱۰ خوانش هم‌تراز شده و وجود یک ORF معنی‌دار) به‌عنوان رویدادهای معتبر پذیرفته شدند. این رویدادها مبنای اصلی برای تحلیل‌های بعدی در مورد مکانیسم‌های مقاومت قرار گرفتند.

فراهمی این داده‌های گسترده، تحلیل‌های مقایسه‌ای موشکافانه‌ای را بین جمعیت مقاوم و حساس در سطوح مختلف ژن، رونوشت و پروتئین، امکان‌پذیر نمود.

۳-۲. آنالیزهای پیشرفته ژنومی و

¹ Novel Predicted Transcripts

² Predicted CDS

³ Coding Sequences

⁴ Accepted Splicing Events

⁵ Google Colaboratory Colab

⁶ Notebook

۲-۵. پیش‌بینی برهم‌کنش‌های-miRNA

mRNA و تجسم شبکه

به‌منظور شناسایی miRNAهای بالقوه‌ای که ژن‌های هدف دارای الگوی پیرایش جایگزین را تنظیم می‌کنند، یک رویکرد چند مرحله‌ای به کار گرفته شد. ابتدا توالی‌های miRNA بالغ^۳ مربوط به گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) به دلیل نزدیکی فیلوژنتیکی با سوروف از پایگاه داده معتبر (miRBase نسخه ۲۲.۱) بازیابی شد. لازم به ذکر است که این پایگاه به <http://www.mirbase.org/> به‌عنوان جامع‌ترین منبع توالی‌های miRNA شناخته می‌شود. در مرحله بعد، پیش‌بینی برهم‌کنش بین miRNAهای بازیابی‌شده و توالی‌های mRNA ژن‌های کاندیدای دارای پیرایش جایگزین (شامل ایزوفرم‌های جدید و شناخته‌شده) با استفاده از پایگاه داده و ابزار آنالین^۴ *psRNATarget* انجام شد. این پایگاه داده با الگوریتمی خاص که برای گیاهان بهینه‌سازی شده است، برهم‌کنش‌ها را پیش‌بینی می‌کند. خروجی حاصل از پیش‌بینی‌ها که شامل جفت‌های miRNA-mRNA بود، برای ساخت یک شبکه برهم‌کنش به نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳.۹.۱ وارد شد. این تحلیل یکپارچه، امکان شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده اصلی را که به‌طور بالقوه بیان ایزوفرم‌های مختلف حاصل از پیرایش جایگزین را تحت تأثیر قرار می‌دهند، فراهم کرد و لایه دیگری از تنظیم پس از رونویسی را در سازوکار مقاومت روشن ساخت (شکل ۵) (Ghorbani et al., 2019).

در ۳۸ Python ترسیم شد (شکل ۳).

۲-۳-۳. نقشه‌یابی کروموزومی و تعیین نواحی ژنومی

مکان دقیق هر رویداد پیرایش بر اساس هم‌ترازی با ژنوم مرجع با استفاده از کتابخانه‌های pybedtools و pysam تعیین شد. این آنالیز شماره کروموزوم، موقعیت ژنومی و *strand* مربوط به هر رویداد را استخراج نمود (شکل ۴). با استفاده از همپوشانی‌یابی^۱ بین مختصات ژنومی رویدادهای پیرایش و فایل حاشیه‌نویسی ژنوم در قالب (GFF/GTF)، وضعیت عملکردی هر ناحیه، از جمله نواحی کدکننده (CDS)، اینترون، UTR، و نواحی بین‌ژنی مشخص شد. این فرآیند با به‌کارگیری کتابخانه Gffutils انجام شد. تعداد خوانش‌های هم‌تراز شده که به‌طور خاص از هر رویداد پیرایش پشتیبانی می‌کنند، مستقیماً از فایل‌های BAM با استفاده از کتابخانه pysam استخراج شد. این معیار به‌عنوان شاخصی کلیدی از اعتبار هر رویداد در نظر گرفته شد (Ghorbani et al., 2019).

۲-۴. بازسازی توالی ایزوفرم‌های جدید^۲

توالی نوکلئوتیدی ایزوفرم‌های جدید برای رویدادهای پیرایش تأیید شده، با الحاق توالی‌های اگزون‌های مجاور بر اساس الگوی اتصال پیش‌بینی‌شده، بازسازی شد. سپس این توالی‌ها از نظر وجود قاب خوانش باز (ORF) و پتانسیل کدکنندگی با استفاده از کتابخانه Biopython مورد بررسی قرار گرفتند (Ghorbani et al., 2019).

¹ Overlap Analysis

² Isoform Reconstruction

³ Mature miRNA

⁴ <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>

۲-۶. آنالیز غنی‌سازی (GO) Gene Ontology و مسیرهای KEGG

۱-۶-۲. به منظور درک عمیق‌تر مفاهیم زیست‌شناختی ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین، آنالیز غنی‌سازی^۱ و مسیرهای KEGG^۲ با استفاده از یک رویکرد تطبیقی و با بهره‌گیری از ژنوم یک گیاه مدل نزدیک انجام شد. با توجه به محدودیت‌های موجود در حاشیه‌نویسی ژنوم علف هرز سوروف، از ژنوم کاملاً حاشیه‌نویسی شده سورگوم به عنوان یک مرجع فیلوژنتیکی نزدیک استفاده شد. توالی‌های پروتئینی ژن‌های کاندیدای سوروف دارای الگوی پیرایش متفاوت، ابتدا در پایگاه داده پروتئینی سورگوم در Ensembl Plants با استفاده از ابزار BLASTP هم‌ترازی شدند. تنها جفت‌های ortholog با درصد شباهت بالا ($E\text{-value} < 1e-10$) و پوشش حداقل ۸۰ درصد) انتخاب شدند و شناسه‌های ژنی متناظر سورگوم استخراج شد (Ghorbani et al., 2019).

سپس آنالیز غنی‌سازی مسیرهای GO و KEGG انجام شد. برای کنترل صحت داده‌ها و کاهش مثبت کاذب، نرخ کشف اشتباه (FDR) کمتر از ۰.۰۵/۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

۲-۶-۲. آنالیز غنی‌سازی در پلتفرم STRING

فهرست نهایی شناسه‌های ژنی orthologهای سورگوم به پایگاه داده STRING (نسخه ۱۲.۰) وارد

شد (Szklarczyk, 2021). از ماژول "Functional Enrichment" این پلتفرم برای انجام آنالیز غنی‌سازی هم‌زمان در چهار دسته اصلی از جمله فرآیندهای اجزای سلول^۳ (شکل ۶)، عملکرد مولکولی^۴ (شکل ۷)، فرایند بیولوژیک^۵ (شکل ۸) و مسیرهای بیوشیمیایی KEGG (شکل ۹)، استفاده شد (Ghorbani et al., 2019).

نتایج و بحث

نمودار ون

نمودار ون مقایسه ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین بین جمعیت مقاوم و حساس را نشان می‌دهد (شکل ۲). نتایج نشان داد که ۲۴ ژن با الگوی پیرایش جایگزین منحصر به فرد در جمعیت مقاوم وجود دارد که می‌توانند نقش عمده‌ای در سازوکار مقاومت به علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل ایفا نمایند. این نمودار به وضوح نشان می‌دهد که پدیده پیرایش جایگزین می‌تواند یک سازوکار مولکولی کلیدی در ایجاد مقاومت به علف‌کش در علف هرز سوروف باشد. وجود ۲۴ ژن با الگوی پیرایش جایگزین منحصر به فرد در جمعیت مقاوم، شواهدی قوی برای این فرضیه است و مسیر را برای شناسایی دقیق این ژن‌ها و نقش عملکردی ایزوفرم‌های تولیدی آن‌ها را هموار می‌نماید.

¹ Gene Ontology (GO)

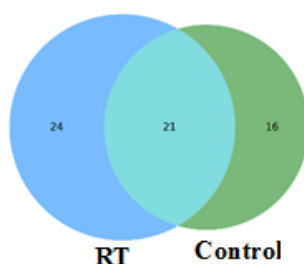
² Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

³ Cellular Component

⁴ Molecular Function

⁵ Biological Process

Alternative Splicing gene comparison (RT vs Control)



شکل ۲. مقایسه ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین بین جمعیت مقاوم و حساس سوروف. نمودار ون، ۲۴ ژن با الگوی پیرایش جایگزین منحصر به فرد را در جمعیت مقاوم (RT) به علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل نشان می‌دهد که کاندیدهای اصلی درگیر در سازوکار مقاومت هستند. ۲۱ ژن مشترک بین دو گروه، نشان‌دهنده رویدادهای پیرایش جایگزین پایه است و ۱۸ ژن منحصر به فرد در گروه کنترل (حساس)، احتمالاً پاسخ به تنش عمومی را منعکس می‌کند.

Figure 2. Venn diagram showing alternative splicing (AS) genes in resistant (RT) and susceptible *Echinochloa crus-galli*. The 24 resistant-specific AS genes represent potential candidates involved in resistance, whereas the 21 genes shared between the two groups may represent common AS events. The 18 susceptible-specific genes may reflect a general stress response.

تولید ایزوفرم‌های پروتئینی مفید به شدت افزایش می‌-

دهد. بررسی توزیع انواع رویدادهای پیرایش جایگزین

نشان داد که اگرچه الگوی کلی رویدادها بین جمعیت

مقاوم و حساس مشابه بود (با غلبه رویداد حفظ

اینترون)، اما فراوانی هر چهار نوع رویداد (IR،

A3SS، A5SS، ES در جمعیت مقاوم به علف‌کش

به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. این امر حاکی از

فعال شدن گسترده مسیر پیرایش جایگزین در پاسخ به

تنش علف‌کش و احتمالاً نقش کلیدی آن در فرآیند

سازگاری و ایجاد مقاومت است (شکل ۳).

نمودار توزیع انواع رویدادهای پیرایش جایگزین

نمودار توزیع انواع مختلف رویدادهای پیرایش

جایگزین به‌خوبی نشان می‌دهد که مقاومت به

علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل در سوروف، تنها

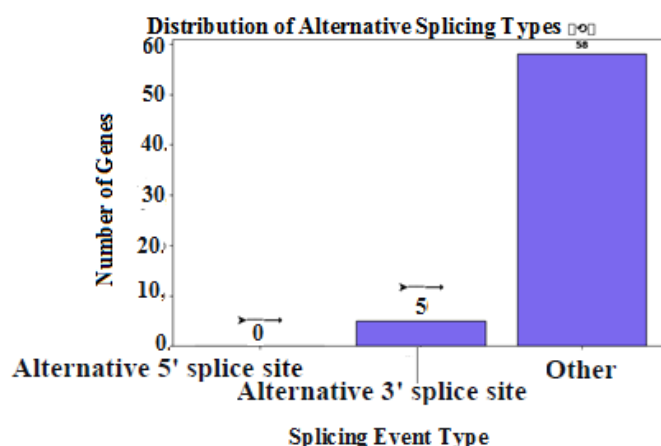
محدود به تغییر در چند ژن خاص نیست، بلکه با یک

افزایش کلی و گسترده در فراوانی تمام انواع

رویدادهای پیرایش جایگزین همراه است. این پاسخ

گسترده، انعطاف‌پذیری ترانسکریپتوم و پروتئوم

جمعیت مقاوم را برای سازگاری با تنش علف‌کش و



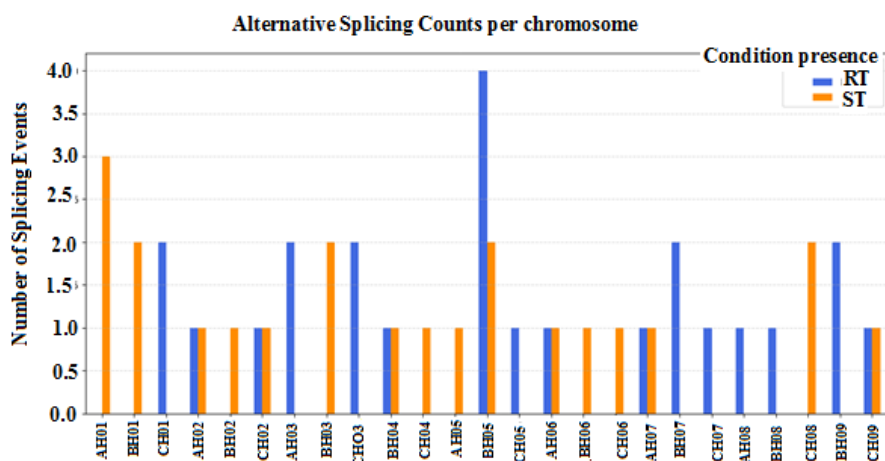
شکل ۳. توزیع انواع رویدادهای پیرایش جایگزین در جمعیت مقاوم و حساس علف‌هرز سوروف. نمودار میله‌ای مقایسه‌ای چهار نوع اصلی رویدادهای پیرایش جایگزین شامل حفظ اینترون، حذف اگزون و استفاده از جایگاه‌های اتصال ۵' و ۳' جایگزین را نشان می‌دهد.

Figure 3. Distribution of alternative splicing event types in resistant and susceptible populations of *Echinochloa crus-galli*. The bar chart shows the distribution of the four main types of alternative splicing events: intron retention, exon skipping, alternative 5' splice site, and alternative 3' splice site.

مانند BH01، CH01 و AH02 به‌طور چشمگیری افزایش یافته بود. این یافته حاکی از آن است که سازوکار مقاومت ممکن است با یک تنظیم فراگیر و افزایش یافته پیرایش جایگزین در سطح ژنومی مرتبط باشد (شکل ۴).

نقشه‌یابی کروموزومی و تعیین نواحی ژنومی

توزیع رویدادهای پیرایش جایگزین در کروموزوم‌های ژنوم سوروف نشان داد که اگرچه الگوی توزیع بین جمعیت مقاوم و حساس مشابه بود، اما تعداد این رویدادها در جمعیت مقاوم در سراسر ژنوم و به ویژه در کروموزوم‌های خاصی



شکل ۴. توزیع رویدادهای پیرایش جایگزین (AS) در کروموزوم‌ها. محور افقی نام کروموزوم‌ها و محور عمودی تعداد کل رویدادهای پیرایش جایگزین شناسایی‌شده در هر کروموزوم را نشان می‌دهد.

Figure 4. Distribution of alternative splicing (AS) events across chromosomes. The horizontal axis represents chromosome names, and the vertical axis represents the total number of AS events identified on each chromosome.

پیش‌بینی برهمکنش‌های *miRNA-mRNA* و تجسم شبکه

ساخت شبکه هم‌بیان و برهم‌کنش بین ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین و *microRNA*ها، یک لایه تنظیمی پیچیده دیگر را آشکار ساخت. این تحلیل نشان داد که تعدادی از *miRNA*های کلیدی، ژن‌های هدف متعددی را که تحت پیرایش جایگزین قرار گرفته‌اند، تنظیم می‌کنند. این هماهنگی بین تنظیم جایگزین و تنظیم پس از رونویسی توسط *miRNA*ها، می‌تواند مکانیسمی ظریف و کارآمد برای Fine-tuning ایزوفرم‌های پروتئینی دخیل در مقاومت باشد. این شبکه نشان می‌دهد که سازوکار مقاومت به علف‌کش در سوروف یک پدیده بسیار پیچیده است

توزیع رویدادهای پیرایش جایگزین در کروموزوم‌های مختلف بین دو گروه الگوی نسبتاً مشابهی را دنبال می‌کند. به‌عنوان مثال، کروموزوم‌های BH01، CH01 و AH02 در هر دو گروه دارای بیشترین تعداد رویداد هستند. این نشان می‌دهد که به‌طور کلی، مناطق مستعد پیرایش جایگزین در ژنوم بین دو جمعیت یکسان است. اما، نکته کلیدی اینجاست که برای تقریباً تمامی کروموزوم‌ها، تعداد پیرایش جایگزین در گروه مقاوم - RT (آبی) به‌طور سیستمی و مشخص بیشتر از گروه حساس - ST (نارنجی) است.

از طریق فناوری (RNAi^۱) ارائه دهد. این شبکه با ۸۴ گره و ۷۲ یال، یک شبکه برهم کنش با اندازه متوسط محسوب می‌شود که ارتباطات تنظیمی بین miRNA ها و ژن‌های دارای پیرایش دگرگون را نمایش می‌دهد. اهمیت تحلیل این شبکه در شناسایی نقش miRNA ها در تنظیم بیان ایزوفرم‌های مختلف حاصل از پیرایش دگرگون نهفته است (شکل ۵).

که در چندین سطح مولکولی رخ می‌دهد. پیرایش جایگزین و تنظیم توسط miRNA می‌تواند به صورت هماهنگ عمل کند تا سطح بیان پروتئین‌های کلیدی دخیل در مقاومت را به دقت کنترل کند. شناسایی miRNA های "هاب" و ژن‌های هدفی که هم تحت پیرایش جایگزین هستند و هم تحت تنظیم miRNA قرار می‌گیرند، می‌تواند اهداف جدید و بسیار مؤثری برای مدیریت این علف‌هرز مقاوم (مثلاً



شکل ۵. شبکه برهم کنش جامع بین ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین (AS) و miRNA های تنظیم کننده

Figure 5. Comprehensive interaction network between alternative splicing (AS)-affected genes and regulatory miRNAs

جایگزین، عمدتاً در سیتوپلاسم هستند. این نتیجه کاملاً با سازوکار عمل علف‌کش‌های شبه‌اکسین هم‌خوانی دارد که اثرات اصلی خود را در سیتوپلاسم آغاز می‌کنند و نشان می‌دهد که تغییر در الگوی جایگزین ممکن است بر فرآیندهایی مانند سیگنالینگ هورمونی، متابولیسم علف‌کش یا پاسخ به تنش در این بخش سلولی تأثیر بگذارد (شکل ۶).

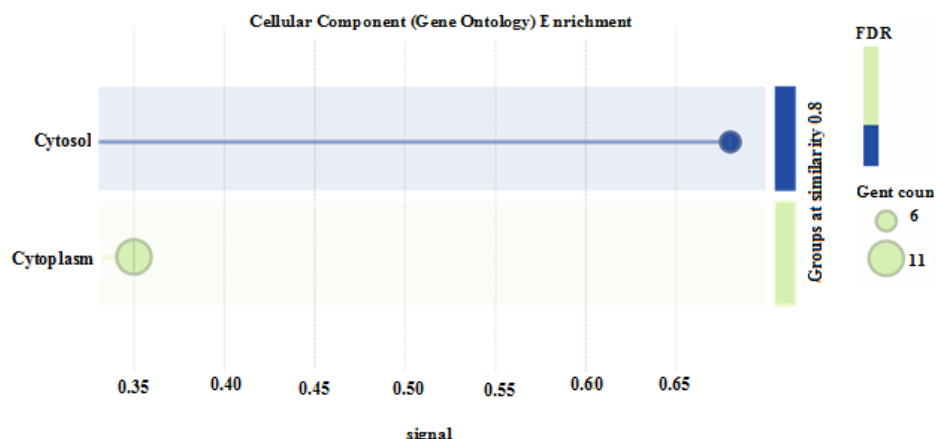
نتایج آنالیز اجزای سلولی^۲

نمودار آنالیز غنی‌سازی^۳ برای دسته اجزای سلولی به‌طور خاص روی دو جزء سلول "سیتوزول" بخش مایع سیتوپلاسم که اندامک‌ها در آن شناورند) و "سیتوپلاسم" (تمام محتوای درون سلول به‌جز هسته) متمرکز شده است. این یافته حاکی از آن است که پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های تحت تأثیر پیرایش

^۱ RNAi (RNA interference)

^۲ Cellular Component

^۳ Gene Ontology (GO)



شکل ۶. نمودار غنای اجزای سلولی. مقادیر محور افقی بین ۰/۳۵ تا ۰/۸۵ نشان‌دهنده میزان غنای رده‌ها است. اعداد روی نمودار نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط و نرخ کشف اشتباه است. داده‌ها حاکی از غنای معنادار در مولفه سیتوپلاسم با ۱۱ ژن و سیتوزول با ۶ ژن می‌باشد.

Figure 6. Cellular component enrichment analysis (Gene Ontology). The values on the horizontal axis, ranging from 0.35 to 0.85, represent the enrichment ratio of the categories. The numbers on the bars indicate the gene count and the false discovery rate (FDR). The data indicate significant enrichment in the cytoplasm component with 11 genes and the cytosol component with 6 genes.

می‌تواند به شدت بر چگونگی پاسخ سلول به علف کش تأثیر بگذارد.

نتایج آنالیز عملکرد مولکولی^۱

نتایج تحلیل غنای مولکولی^۲ نشان‌دهنده اثر معنی‌دار دو دسته اصلی از عملکردهای مولکولی است. دسته اول شامل عملکردهای بسیار تخصصی و مرتبط با مسیرهای متابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر تیروزین و فنیل‌آلانین می‌باشد، که عمدتاً بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند:

L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase
Prephenate Transaminase activity
dehydrogenase activity (برای هر دو کوفاکتور NAD^+ و $NADP^+$)
hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity
متمرکز هستند. دسته دوم نیز عملکردهای عمومی‌تر اما همچنان معنی‌داری همچون اتصال به پیریدوکسال فسفات (کوفاکتور رایج ترانس آمینازها) و فعالیت کاتالیتیک را دربرمی‌گیرد که درمجموع نشان از

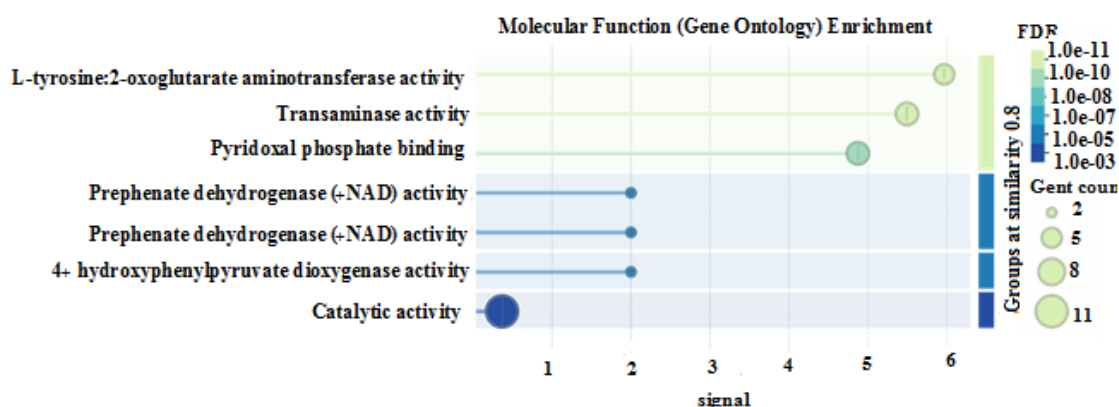
این یافته کاملاً با سازوکار عمل علف کش فلوپیراکسیفن-بنزیل که یک علف کش شبه‌اکسین است هم‌خوانی دارد. عمده فعالیت هورمون اکسین (IAA) و علف‌کش‌های شبه‌اکسین، از طریق گیرنده‌های اکسین مانند خانواده TIR1/AFB که در سیتوزول قرار دارند و مسیرهای سیگنالینگ که در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتند و همچنین پروتئین‌های پاسخ به تنش که در سیتوپلاسم فعال هستند، در سیتوپلاسم آغاز می‌شوند. آنزیم‌های سم‌زدایی مانند سیتوکروم P450 یا گلوکونایون اس-ترانسفراز که علف کش را متابولیزه می‌کنند، عمدتاً در سیتوزول یا شبکه آندوپلاسمی (که بخشی از سیتوپلاسم است) قرار دارند. رویدادهای پیرایش جایگزین می‌توانند با اضافه یا حذف کردن توالی‌های سیگنال، محل قرارگیری نهایی پروتئین در سلول را تغییر دهند. بنابراین، تولید ایزوفرم‌های مختلف از این پروتئین‌های سیتوپلاسمی

¹ Molecular Function

² Gene Ontology: Molecular Function

متابولیسم تیروزین و اسیدهای آمینه آروماتیک متمرکز هستند. این یافته می‌تواند حاکی از نقش محوری این ژن‌ها در یک فرآیند زیستی خاص تحت مطالعه باشد (شکل ۷).

تمرکز قوی مجموعه ژن‌های مورد مطالعه بر عملکردهای کاتالیتیکی دارد. نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که مجموعه ژن‌های مورد تحلیل، به‌شدت در عملکردهای مولکولی مرتبط با



شکل ۷. نمودار غنای عملکرد مولکولی. تحلیل غنای عملکرد مولکولی نشان می‌دهد که عملکردهای آنزیمی مرتبط با مسیر متابولیک تیروزین و اسیدهای آمینه آروماتیک (مانند فعالیت‌های ترانس آمیناز، دهیدروژناز و دی‌اکسیژناز) به‌طور بسیار معنی‌داری (مقادیر FDR در محدوده $1.0e-11$ تا $1.0e-03$) در بین مجموعه ژن‌های مورد مطالعه غنی‌شده‌اند. اعداد روی نمودار تعداد ژن‌های مرتبط با هر اصطلاح را نشان می‌دهد. گروه‌بندی بر اساس شباهت ۰/۸ انجام شده است.

Figure 7. Gene Ontology (GO) Molecular Function Enrichment Plot. The GO enrichment analysis reveals that enzymatic functions related to the tyrosine and aromatic amino acid metabolic pathway (such as transaminase activity, dehydrogenase activity, and dioxygenase activity) are significantly enriched within the studied gene set (FDR values ranging from 1.0×10^{-3} to 1.0×10^{-11}). The numbers on the plot indicate the number of genes associated with each term. Grouping is based on a similarity threshold of 0.8.

اسیدهای کربوکسیلیک^۱ نشان داد. این یافته قویاً نشان می‌دهد که سازوکار مقاومت احتمالاً از طریق تغییر در مسیرهای متابولیسم ثانویه^۲ و افزایش ظرفیت گیاه برای سم‌زدایی علف‌کش عمل می‌کند. تولید ایزوفرم‌های مختلف از آنزیم‌های کلیدی این مسیرها از طریق پیرایش جایگزین، می‌تواند کارایی فرآیندهای الحاق سازی و دفع علف‌کش را افزایش دهد (شکل ۸).

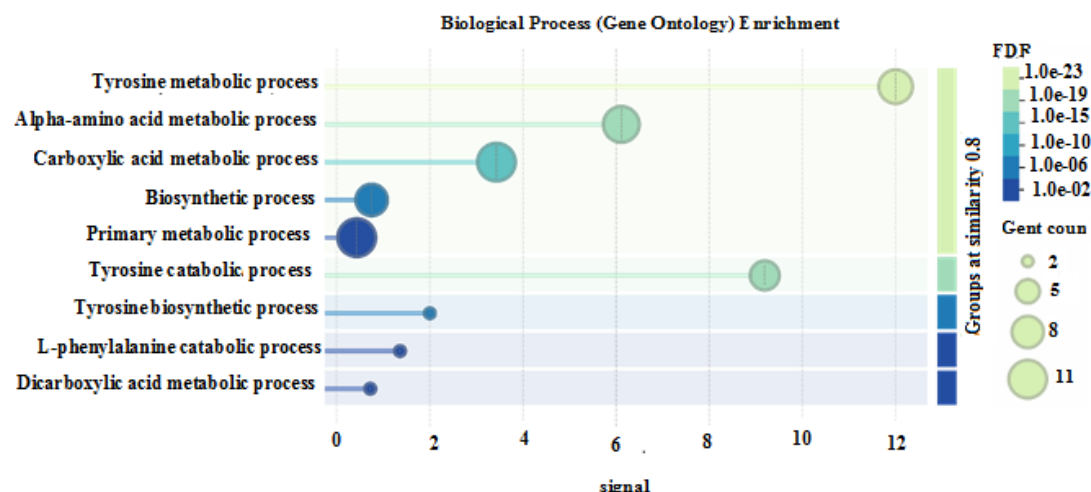
تجزیه و تحلیل فرآیند زیستی^۱

آنالیز غنای اجزای سلولی برای دسته فرایندهای بیولوژیکی نشان می‌دهد ژن‌های تحت پیرایش جایگزین، g در کدام فرآیندهای زیستی به‌طور معنی‌داری غنی‌سازی شده‌اند. آنالیز غنی‌سازی^۲ برای فرآیندهای بیولوژیکی، غنی‌سازی بسیار معنی‌داری را در فرآیندهای متابولیسمی، به‌ویژه «متابولیسم تیروزین»، «متابولیسم آلفا-آمینواسیدها» و «متابولیسم

¹ Biological Process

² Gene Ontology

³ Secondary metabolism



شکل ۸. نمودار غنای فرآیندهای زیستی (*Gene Ontology*). تحلیل حاضر نشان می‌دهد که فرایندهای متابولسمی مرتبط با تیروزین و اسیدهای آمینه آلفا به‌طور بسیار معنی‌داری در مجموعه ژن‌های مورد مطالعه غنی شده‌اند. فرایندهای غنی‌شده شامل متابولیسم تیروزین، فرایندهای کاتابولیسمی و بیوسنتزی آن و همچنین فرایندهای متابولیسم گسترده‌تر اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشند. عدد نمایش داده‌شده در نمودار نشان‌دهنده تعداد ۱۱ ژن مرتبط با خوشه‌ی اصلی است. گروه‌بندی بر اساس سطح شباهت ۰/۸ انجام شده است.

Figure 8. Gene Ontology (GO) Biological Process Enrichment plot. The current analysis reveals that metabolic processes related to tyrosine and alpha-amino acids are significantly enriched in the studied gene set. The enriched processes include tyrosine metabolism, its catabolic and biosynthetic processes, as well as broader carboxylic acid metabolic processes. The number displayed on the chart represents the 11 genes associated with the main cluster. Grouping was performed based on a similarity threshold of 0.8.

بسیاری از این ترکیبات ثانویه در فرآیندهای سم‌زدایی و دفاعی گیاه نقش دارند. گیاهان اغلب علف‌کش‌ها را با الحاق کردن آنها با مولکول‌هایی مانند اسیدهای آمینه، قندها یا گلوکوتانیون غیرفعال می‌کنند. تغییر در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌تواند ذخیره این پیش‌سازها را برای غیرفعال کردن علف‌کش افزایش دهد.

رویدادهای پیرایش جایگزین در ژن‌های آنزیم‌های کلیدی این مسیرهای متابولسمی (مثلاً آنزیم‌های دخیل در متابولیسم تیروزین) می‌تواند منجر به تولید ایزوفرم‌های پروتئینی با فعالیت کاتالیتیکی متفاوت، میل پیوندی متفاوت با سوبسترا، یا پایداری متفاوت

این نمودار، نتایج بسیار جالب و قابل‌توجهی را نشان می‌دهد که مستقیماً با سازوکار مقاومت مرتبط است. تقریباً تمامی فرایندهای غنی‌شده‌ی برتر از جمله فرآیند متابولیسم تیروزین^۱، متابولیسم آلفا-آمینواسیدها^۲، متابولیسم اسیدهای کربوکسیلیک^۳، فرایندهای بیوسنتزی^۴، فرایندهای کاتابولیسم و بیوسنتز تیروزین^۵، کاتابولیسم فنیل آلانین^۶، متابولیسم اسیدهای دی‌کربوکسیلیک^۷، به متابولیسم‌هایی مربوط می‌شوند که به‌طور خاص، فرایندهای غنی‌شده حول محور متابولیسم اسیدهای آمینه هستند.

اسیدهای آمینه مانند تیروزین و فنیل‌آلانین پیش‌سازهای مهم برای ترکیبات ثانویه گیاهی هستند.

¹ Tyrosine Metabolic Process

² Alpha-Amino Acid Metabolic Process

³ Carboxylic Acid Metabolic Process

⁴ Biosynthetic Process

⁵ Tyrosine Catabolic/Biosynthetic Process

⁶ L-Phenylalanine Catabolic Process

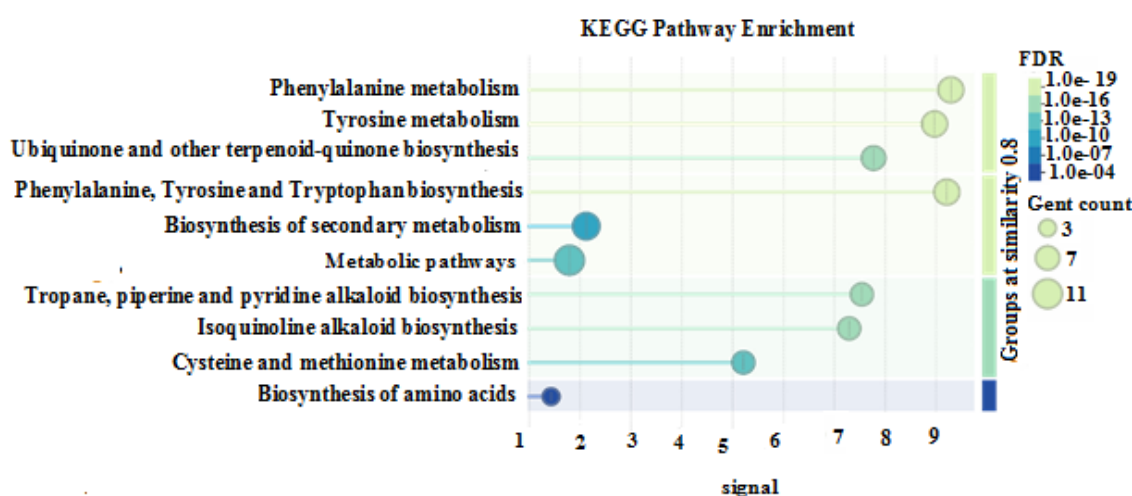
⁷ Dicarboxylic Acid Metabolic Process

ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین در جمعیت مقاوم غنی‌سازی شده‌اند. آنالیز غنی‌سازی مسیرهای KEGG، غنی‌سازی بسیار معنی‌داری را در مسیرهای متابولیسمی کلیدی مرتبط با سم‌زدایی علف‌کش نشان داد. مسیرهای متابولیسم فیل آلانین و تیروزین و همچنین بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان برجسته‌ترین مسیرها شناسایی شدند. این یافته قویاً از سازوکار مقاومت غیر محل هدف از طریق افزایش متابولیسم و سم‌زدایی علف‌کش حمایت می‌کند. به نظر می‌رسد جمعیت مقاوم با تولید ایزوفرم‌های جایگزین از آنزیم‌های کلیدی این مسیرها، توانایی خود را برای الحاق‌سازی و خنثی‌سازی علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل به طور چشمگیری افزایش داده است (شکل ۹).

شود. این تغییرات می‌تواند کارایی مسیرهای سم‌زدایی را در جمعیت مقاوم به طور چشمگیری افزایش دهد. این نمودار به‌شدت از این فرضیه حمایت می‌کند که سازوکار مقاومت در علف‌هرز سوروف، تا حد زیادی برپایه بازتنظیم مسیرهای متابولیسمی، به‌ویژه متابولیسم اسیدهای آمینه استوار است. به‌نظر می‌رسد جمعیت مقاوم با تغییر الگوی جایگزین در ژن‌های کلیدی متابولیسمی، توانایی خود را برای تولید پیش‌سازهای لازم برای غیرفعال کردن علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل افزایش داده است. این یک سازوکار مقاومت غیر محل هدف بسیار متداول و کارآمد است.

آنالیز مسیرهای KEGG

نمودار آنالیز مسیرهای KEGG مسیرهای بیوشیمیایی خاصی را نشان می‌دهد که به‌طور معنی‌داری در میان



شکل ۹. نمودار غنای مسیرهای KEGG. محور عمودی نام مسیرهای بیوشیمیایی و اعداد روی نوارها تعداد ژن‌های که در آن مسیر KEGG خاص قرار می‌گیرند را نشان می‌دهد.

Figure 9. KEGG pathway enrichment plot. The vertical axis shows the names of the biochemical pathways, and the numbers on the bars indicate the number of genes associated with each specific KEGG pathway.

قوی در مسیرهای متابولیسمی خاص به‌وضوح در دو دسته اصلی قرار می‌گیرند: دسته اول شامل متابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک است که متابولیسم

این نمودار نتایج بسیار مهم و کاملاً مشخصی را ارائه می‌دهد که سازوکار مقاومت را به‌وضوح نشان می‌دهد، به‌طوری که در این مطالعه، غنی‌سازی بسیار

فنیل آلانین، متابولیسم تیروزین و بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان را در برمی‌گیرد؛ و دسته دوم مربوط به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است، از جمله بیوسنتز یوبی‌کینون و سایر کینون‌های ترپنوئیدی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان، پیریدین و پیریدین، و همچنین بیوسنتز آلکالوئیدهای ایزو کینولین را در برمی‌گیرد.

سم‌زدایی از طریق الحاق‌سازی: این یافته شاهی قاطع بر سازوکار مقاومت غیر محل هدف از طریق افزایش سم‌زدایی^۱ است. گیاهان اغلب علف‌کش‌ها را از طریق الحاق‌سازی با اسدهای آمینه مانند فنیل آلانین یا تیروزین غیرفعال کرده و دفع می‌کنند. همچنین علف‌کش می‌تواند در ساختار متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها گنجانده شود. تغییر در جایگزین ژن‌های کلیدی این مسیرها (مثلاً آنزیم‌های ترنسفراز یا سنتتازها) می‌تواند کارایی این فرآیندهای سم‌زدایی را به شدت افزایش دهد. مسیرهای متابولیسمی نظیر متابولیسم سیستمین و متیونین و بیوسنتز اسیدهای آمینه، می‌توانند پیش‌سازهای ضروری را برای واکنش‌های سم‌زدایی فراهم نمایند. مسیرهای متابولیسمی یک چارچوب کلی و فراگیر است که سایر مسیرهای اشاره‌شده را در برمی‌گیرد.

نمودار KEGG به‌وضوح نشان می‌دهد که جمعیت مقاوم سوروف، با دستکاری مسیرهای متابولیسمی

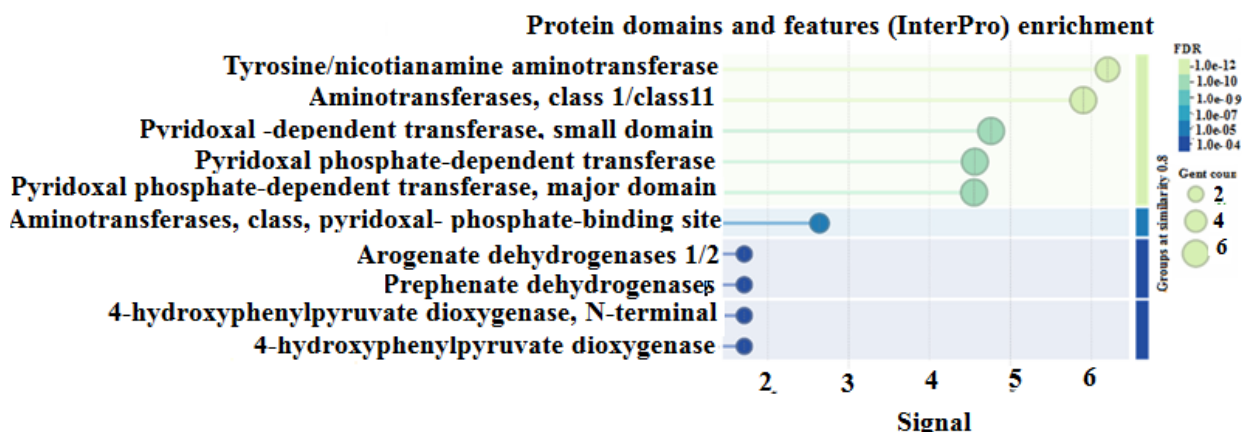
خاص از طریق پیرایش جایگزین، یک کارخانه سم‌زدایی بسیار کارآمد در خود ایجاد کرده است. این کارخانه بر پایه متابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک و تولید متابولیت‌های ثانویه بنا شده تا علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل را به‌دام انداخته، غیرفعال کرده و نهایتاً از بین ببرد.

آنالیز دامنه‌ها و ویژگی‌های پروتئینی^۲

نمودار آنالیز دامنه‌ها و ویژگی‌های پروتئینی نشان می‌دهد که کدام دامنه‌های عملکردی پروتئینی به‌طور معنی‌داری در میان ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین در جمعیت مقاوم غنی‌سازی شده‌اند. آنالیز غنی‌سازی دامنه‌های پروتئینی، غنی‌سازی بسیار معنی‌داری را در دامنه‌های مرتبط با خانواده آنزیم‌های «آمینوترانسفراز وابسته به پیریدوکسال فسفات» نشان داد. این یافته، همراه با نتایج آنالیز مسیرهای KEGG، به‌وضوح نشان می‌دهد که سازوکار مقاومت در سطح مولکولی احتمالاً از طریق تولید ایزوفرم‌های جایگزین از آنزیم‌های کلیدی انتقال‌دهنده گروه آمین عمل می‌کند. این ایزوفرم‌ها ممکن است با افزایش کارایی متابولیسم اسیدهای آمینه و یا مستقیماً با متابولیزه کردن مولکول علف‌کش، باعث سم‌زدایی و در نهایت مقاومت شوند (شکل ۱۰).

^۱ Enhanced Metabolism

^۲ InterPro



شکل ۱۰. نمودار غنای دامنه‌ها و ویژگی‌های پروتئینی بر پایه پایگاه InterPro. نتایج غنی‌سازی، وجود معنادار دامنه‌های پروتئینی مرتبط با خانواده آنزیم‌های وابسته به پیریدوکسال فسفات (به‌ویژه آمینوترانسفرازها) و آنزیم‌های کلیدی در مسیر متابولیسم تیروزین (مانند دهیدروژنازها و دی‌اکسیژناز) را نشان می‌دهد. اعداد روی نمودار تعداد ژن‌های مرتبط با هر دامنه را نشان می‌دهند.

Figure 10. Enrichment plot of protein domains and features based on the InterPro database. The enrichment results indicate significant enrichment of protein domains associated with pyridoxal phosphate-dependent enzyme families, particularly aminotransferases, and key enzymes involved in the tyrosine metabolic pathway, such as dehydrogenases and dioxygenases. The numbers on the plot indicate the number of genes associated with each domain.

هم‌خوانی کامل با نتایج حاصل از آنالیزهای GO و KEGG دارد و ۳) مشارکت مستقیم در فرآیندهای سم‌زدایی از طریق انتقال گروه آمین به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم سم‌زدایی علف‌کش‌ها، است. این آنزیم‌ها قادرند با تغییر مستقیم در ساختار علف‌کش، موجب غیرفعال شدن آن شوند یا پیش‌سازهای لازم برای واکنش‌های الحاقی را تولید نمایند، نام برد. از دیگر آنزیم‌های مؤثر در مسیرهای مرتبط می‌توان به ۱) آروژنات دهیدروژناز / فنیل‌پیرووات دهیدروژناز^۱ این آنزیم‌ها در مسیر بیوستز اسیدهای آمینه آروماتیک (تیروزین و فنیل‌آلانین) نقش ایفا می‌کنند و ۲) ۴-هیدروکسی‌فنیل‌پیرووات دی‌اکسیژناز^۲ یک آنزیم کلیدی در مسیر تجزیه تیروزین محسوب می‌شود. شایان ذکر است که این آنزیم خود هدف بسیاری از علف‌کش‌ها بوده و تغییرات در آن از طریق

این نمودار، یافته‌های پیشین را به سطحی دقیق از عملکرد مولکولی ارتقا می‌بخشد و نتایج قابل‌توجهی را نمایان می‌سازد. غنی‌سازی بسیار چشمگیر در آنزیم‌های آمینوترانسفراز مشاهده شد: تقریباً تمامی دامنه‌های غنی‌شده برتر به یک خانواده آنزیمی خاص تعلق داشتند که شامل آمینوترانسفراز (class I/ class II)، ترانسفراز وابسته به پیریدوکسال فسفات، و تیروزین/تیرامین آمینوترانسفراز هستند. آنزیم‌های کلیدی در مسیرهای سم‌زدایی شامل آمینوترانسفرازها می‌شوند. این آنزیم‌ها انتقال گروه آمین را از یک مولکول دهنده (نظیر یک اسید آمینه) به یک مولکول پذیرنده (مانند یک اسید آلفا-کتو) کاتالیز می‌کنند. از ویژگی‌های این آنزیم‌ها می‌توان به ۱) وابستگی به کوآنزیم پیریدوکسال فسفات (PLP) که در داده‌های نمودار نیز مورد تأیید قرار گرفته است، ۲) دارای نقش محوری در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌باشند که

¹ Arogenate Dehydrogenase / Prephenate Dehydrogenase

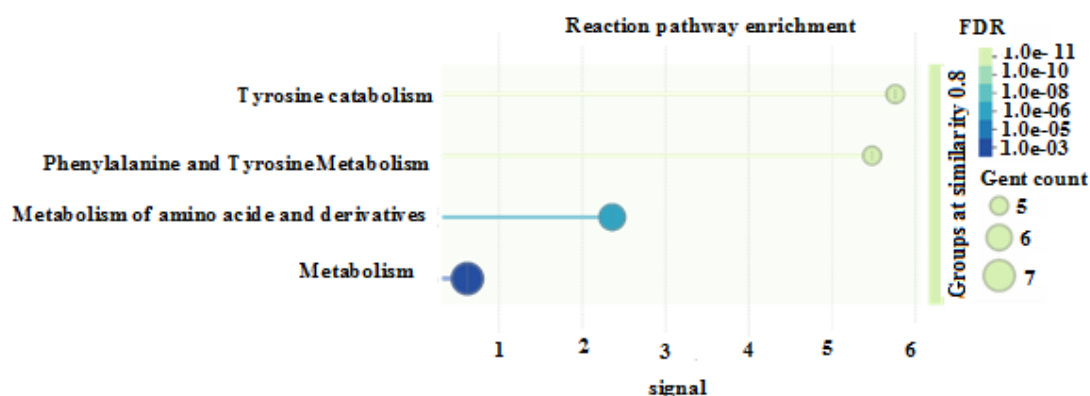
² 4-hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD)

نمودار آنالیز مسیرهای Reactome

تحلیل‌های مسیر زیستی با استفاده از پایگاه داده Reactome انجام شد که به دلیل مدل داده‌ای مبتنی بر واکنش‌های بیوشیمیایی گسسته، قادر به ارائه تصویری با وضوح مولکولی بالاتری از مسیرها در مقایسه با KEGG است. این رویه با هدف شناسایی دقیق‌ترین زنجیره‌های واکنشی و مسیرهای اختصاصی تغییر یافته در جمعیت مقاوم به کار گرفته شد. نتایج حاصل از تحلیل غنی‌سازی، مسیرهای بیولوژیک بسیار خاصی را آشکار کرد که به طور معنی‌داری با مجموعه ژن‌های واجد پیرایش جایگزین در جمعیت مقاوم مرتبط بودند (شکل ۱۱).

رویدادهای پیرایش جایگزین می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد، اشاره نمود.

نتایج حاصل از تحلیل دامنه‌ها و ویژگی‌های پروتئینی، سازوکار مولکولی دقیقی را آشکار می‌سازد. به نظر می‌رسد جمعیت مقاوم علف‌هرز سوروف، با تولید ایزوفرم‌های جایگزین از آنزیم‌های آمینوترانسفراز وابسته به پیریدوکسال فسفات (PLP)، سیستمی بسیار کارآمد برای سم‌زدایی ایجاد کرده است. این ایزوفرم‌های جدید احتمالاً از ویژگی‌های کاتالیتیکی بهبود یافته‌ای برخوردارند که به آن‌ها امکان می‌دهد یا مستقیماً علف‌کش را متابولیزه نمایند یا پیش‌سازهای اسید آمینه مورد نیاز برای فرآیند کونزوگه‌سازی را با کارایی و سرعت بالاتر تولید کنند.



شکل ۱۱. نمودار غنای مسیرهای واکنشی. این تحلیل، مسیرهای متابولیسمی را که به طور معنی‌داری در مجموعه داده مورد مطالعه غنی شده‌اند، نشان می‌دهد. میله‌ها نمایانگر میزان غنای آماری هر مسیر هستند. اعداد مربوط به تعداد ژن‌های مرتبط (Gene count) و سطح معنی‌داری آماری (FDR) برای هر مسیر در نمودار نمایش داده شده‌اند.

Figure 11. Reaction pathway enrichment plot. This analysis shows the metabolic pathways that are significantly enriched in the studied dataset. The bars represent the statistical enrichment level of each pathway. The numbers corresponding to the associated gene count and statistical significance level (FDR) for each pathway are displayed in the enrichment plot.

کلیدی شناسایی شده در سایر تحلیل‌ها بوده، اما با نام‌گذاری دقیق‌تر و اختصاصی‌تری ارائه شده‌اند. از جمله این مسیرها می‌توان به کاتابولیسم تیروزین اشاره کرد که به طور خاص تجزیه هدفمند این اسید آمینه (و نه متابولیسم کلی آن) را نشان می‌دهد و

شایان ذکر است که نمودار Reactome یافته‌های تحلیلی پایگاه‌های داده GO، KEGG و InterPro را نه تنها تأیید می‌نماید، بلکه با ارائه سطح تفصیل بالاتر، نتایج را با وضوح بیشتری نشان می‌دهد. مسیرهای غنی شده برتر در Reactome کاملاً منطبق بر مسیرهای

حساس، الگوی کاملاً متمایزی از رویدادهای پیرایش جایگزین را آشکار ساخت. به‌طور مشخص، ۲۴ ژن با الگوی پیرایش جایگزین منحصر به فرد در جمعیت مقاوم شناسایی شد که غیاب آن‌ها در جمعیت حساس، نقش محوری آن‌ها در فرآیند مقاومت را نشان می‌دهد.

افزایش کمی معنادار در فراوانی تمامی انواع رویدادهای پیرایش جایگزین (به‌ویژه حفظ اینترون و استفاده از جایگاه‌های اتصال جایگزین) در جمعیت مقاوم، حاکی از فعال‌شدن یک پاسخ ترانسکریپتوم گسترده و هماهنگ به تنش علف‌کش است (Liu et al., 2018). این پاسخ منجر به ایجاد یک تنوع عملکردی سریع در سطح پروتئوم می‌شود که امکان انطباق و بقای گیاه را فراهم می‌کند (Nilsen & Graveley, 2010).

آنالیزهای غنی‌سازی هم‌گرا (GO, KEGG, Reactome, InterPro) به‌طور قاطعانه‌ای نشان داد که این سازوکار مقاومت، یک مقاومت غیر محل هدف مبتنی بر افزایش سم‌زدایی متابولیسم علف‌کش است (Powles & Yu, 2010). غنی‌سازی بسیار معنادار مسیرهای مرتبط با "متابولیسم تیروزین و فنیل آلانین و بیوستنز متابولیت‌های ثانویه" (Kanehisa et al., 2021; Gillespie et al., 2022)، همراه با غنی‌سازی دامنه‌های پروتئینی "آمینوترانسفرازهای وابسته به پیریدوکسال فسفات" (InterPro Consortium, 2019)، نشان می‌دهد که جمعیت مقاوم مسیرهای متابولیسمی خود را برای غیرفعال‌کردن علف‌کش بهینه کرده است. به نظر می‌رسد تولید ایزوفرم‌های جایگزین از آنزیم‌های کلیدی این مسیرها (مانند ژن کاندیدی برتر CSXV2_SORB1)، کارایی

احتمالاً در تأمین انرژی یا پیش‌سازهای سم‌زدایی در جمعیت مقاوم نقش دارد. مسیر متابولیسم فنیل آلانین و تیروزین نیز به‌عنوان چارچوبی کلی‌تر، هر دو اسید آمینه آروماتیک را پوشش می‌دهد؛ درحالی‌که دسته‌های گسترده‌تر "متابولیسم اسیدهای آمینه و مشتقات آنها" و "متابولیسم" اهمیت کلی تغییرات متابولیسمی را تأیید می‌کنند. حضور مسیر بسیار اختصاصی "کاتابولیسم تیروزین" در صدر فهرست، حاکی از افزایش قابل‌توجه تجزیه تیروزین برای تولید پیش‌سازهای مورد نیاز در واکنش‌های کونژوگه‌سازی علف‌کش در جمعیت مقاوم است. این نتایج هماهنگی کاملی با یافته‌های سایر تحلیل‌ها از جمله غنی‌سازی متابولیسم اسید آمینه در GO، مسیر متابولیسم فنیل آلانین و تیروزین در KEGG و شناسایی آمینوترانسفرازها در دامنه‌ها و ویژگی‌های پروتئینی نشان می‌دهد. در نهایت، نمودار Reactome به‌عنوان تکمیل‌کننده نهایی پازل، شواهد قطعی ارائه می‌دهد که سازوکار مقاومت در علف‌هرز سوروف بر بازبرنامه‌ریزی مسیرهای کاتابولیسم و متابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک از طریق پیرایش دگرسان استوار است که منجر به تولید ایزوفرم‌های کارآمدتر آنزیم‌های غیرفعال‌ساز و دفع علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این مطالعه به‌وضوح نشان داد که پدیده پیرایش جایگزین یک سازوکار مولکولی کلیدی در ایجاد مقاومت به علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل در علف‌هرز سوروف محسوب می‌شود (Filichkin et al., 2012; Syed et al., 2015). تجزیه و تحلیل جامع ترانسکریپتوم جمعیت مقاوم در مقایسه با جمعیت

فرایندهای الحاق‌سازی علف‌کش با مولکول‌های درون‌سلولی مانند اسیدهای آمینه را افزایش داده است (Yuan et al., 2007). علاوه بر این، شبکه تنظیمی پیچیده بین ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین و *miRNA*ها، وجود یک لایه تنظیمی پس از رونویسی ظریف و دقیق را برای هماهنگی این پاسخ نشان می‌دهد (Li & Howe, 2001; Zheng et al., 2017). این مطالعه برای اولین بار نقش محوری پیرایش جایگزین را در مقاومت به علف‌کش‌های شبه-اکسین در یک علف هرز مهم برنج نشان می‌دهد و زمینه را برای توسعه راهکارهای جدید مدیریتی، مانند طراحی نشانگرهای مولکولی برای پایش مقاومت یا استفاده از فناوری RNAi برای هدف قرار دادن ایزوفرم‌های خاص مقاومت، فراهم می‌کند (Varshney et al., 2009; Edwards & Batley, 2010).

مطالعه حاضر شواهد قانع‌کننده‌ای ارائه می‌دهد که جمعیت مقاوم سوروف از سازوکار پیچیده‌ای مبتنی بر تنوع‌زایی رونوشتی از طریق پیرایش جایگزین برای غلبه بر تنش علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل بهره می‌برد. این استراتژی انعطاف‌پذیر، به گیاه این امکان را می‌دهد که بدون نیاز به جهش‌های ژنتیکی پایدار و پرهزینه در توالی رمزکننده، به سرعت و با کارایی بالا، یک چهره پروتئومی جدید ایجاد کند که با شرایط تنش سازگار است. تمرکز خاص مسیرهای غنی‌شده بر متابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک (تیروزین و فنیل‌آلانین) از چند منظر قابل توجه است. اولاً، این اسیدهای آمینه پیش‌سازهای کلیدی برای بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات ثانویه دفاعی، از جمله

فنول‌ها، آلکالوئیدها و کینون‌ها هستند. به نظر می‌رسد جمعیت مقاوم با تغییر الگوی بیان ایزوفرم‌های آنزیم‌های مسیر (مانند آمینوترانسفرازها و دی‌اکسیژنازها)، ظرفیت بیوسنتزی خود را برای تولید این مولکول‌های دفاعی افزایش داده است. این ترکیبات می‌توانند به‌طور مستقیم با مولکول علف‌کش برهم‌کنش داده و آن را از طریق به‌دام‌اندازی^۱ در واکوئل یا دیواره سلولی غیرفعال کنند. ثانیاً، خود این اسیدهای آمینه می‌توانند به‌عنوان واحدهای سازنده برای کوئژوگه‌سازی مستقیم با مولکول علف‌کش عمل کنند، فرایندی که توسط آنزیم‌هایی مانند گلوکاتایون اس-ترانسفرازها یا گلیکوزیل ترانسفرازها کاتالیز می‌شود. احتمالاً ایزوفرم‌های جدید تولیدشده از این آنزیم‌ها از طریق پیرایش جایگزین، میل پیوندی و سوبسترای اختصاصی‌تری برای علف‌کش فلوپیراکسیفن-بنزیل پیدا کرده‌اند.

نکته جالب توجه، شناسایی مسیر کاتابولیسم تیروزین در صدر نتایج Reactome است. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده یک استراتژی دوگانه باشد، که از یک سو، تأمین پیش‌ساز برای سم‌زدایی و از سوی دیگر، تأمین سریع انرژی (ATP) و کربن از طریق تجزیه این اسید آمینه برای تأمین هزینه‌های متابولیسمی سنگین فرایند سم‌زدایی، می‌باشد. این موضوع که یک گیاه چگونه منابع خود را بین فرآیندهای رشد و دفاع اختصاص می‌دهد، یک سؤال کلیدی در بوم‌شناسی گیاهی است و به نظر می‌رسد جمعیت مقاوم سوروف با بازتنظیم مسیرهای متابولیسمی خود از طریق پیرایش جایگزین، به این سؤال پاسخ داده است.

¹ Sequestration

و لزوم حرکت به سمت راهکارهای یکپارچه و مبتنی بر درک مکانیسم‌های پایه را پررنگ می‌کند. با این حال، برای تأیید دقیق‌تر نتایج حاصل از آنالیزهای ترانسکریپتومیک و اعتبارسنجی تغییرات بیان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیرهای شناسایی شده (از جمله ژن‌های مرتبط با پیرایش دگرگون، متابولیسم و تنظیم پس از رونویسی)، انجام آزمایش‌های تکمیلی با استفاده از روش Real-Time PCR کمی (qRT-PCR) پیشنهاد می‌شود. این روش می‌تواند با دقت و حساسیت بالا، الگوی بیان تعدادی از ژن‌های کاندیدای مرتبط با مقاومت را در جمعیت‌های مقاوم و حساس تحت تیمار با علف‌کش مورد سنجش قرار داده و نتایج حاصل از توالی‌یابی (RNA-Seq) را به صورت مستقل تأیید نماید. چنین اعتبارسنجی‌هایی گامی ضروری برای تبدیل یافته‌های اکتشافی این مطالعه به اهداف مولکولی مشخص برای پژوهش‌های آتی در زمینه مدیریت مقاومت به علف‌کش‌ها است.

همچنین، برهم‌کنش شبکه‌ای miRNAها با ژن‌های تحت تأثیر پیرایش جایگزین، نشان‌دهنده وجود یک سازوکار بازخورد ظریف است. این احتمال وجود دارد که برخی از ایزوفرم‌های تولید شده، خود تنظیم‌کننده بیان miRNAهای خاصی باشند که به نوبت، بیان سایر ژن‌های کلیدی شبکه را تعدیل می‌کنند. این شبکه تنظیمی پیچیده، توانایی گیاه را برای ایجاد یک پاسخ متعادل و بهینه به تنش علف‌کش به حداکثر می‌رساند. در نتیجه، این مطالعه نه تنها یک سازوکار مولکولی جدید برای مقاومت به علف‌کش را فاش می‌کند، بلکه بینش‌های ارزشمندی در مورد انعطاف‌پذیری و سازگاری ترانسکریپتومیک در علف‌های هرز ارائه می‌دهد. به جای تکیه بر یک سازوکار ساده، جمعیت مقاوم از یک استراتژی شبکه‌ای چندوجهی استفاده می‌کند که در آن پیرایش جایگزین، متابولیسم و تنظیم پس از رونویسی، به طور هماهنگ برای خنثی کردن علف‌کش همکاری می‌کنند. این یافته‌ها بر چالش‌های پیش‌روی مدیریت مقاومت تأکید کرده

منابع

- Bryson, C.T. & DeFelice, M.S., 2009. Weeds of the South; University of Georgia Press: Athens, GA, USA, pp. 373–374.
- Chauhan, B.S & Abugho, S.B., 2012. Effect of growth stage on the efficacy of postemergence herbicides on four weed species of direct-seeded rice. *Sci World J.* doi:10.1100/2012/123071.
- CLC Genomics Workbench, 2023. Qiagen Bioinformatics. <https://digitalinsights.qiagen.com>
- Edwards, D. and Batley, J. 2010. Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnol. J.*, 8(2): 2–9.
- Elahifard, E., Ghanbari, A., Rashed Mohassel, M. H., Zand, E., Mirshamsi Kakhki, A., Mohkami, A., 2013. Characterization of triazine resistant populations of junglerice (*Echinochloa colona* (L.) Link.) found in Iran. *Australian Journal of Crop Science*, 7: 1302–1308.
- Filichkin, S.A., Priest, H.D., Givan, S.A., Shen, R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong, W.K., Mockler, T.C., 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 20: 45–58. doi: 10.1101/gr.093302.109.
- Filichkin, S. A., Priest, H.D., Givan, S.A., 2015. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 20(1): 45–58.
- Filichkin, S.A., Priest, H.D., Givan, S.A., 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 20: 45–58 DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.093302.109>
- Ghorbani, A., Tahmasebi, A., Izadpanah, K., Afsharifar, A., Dietzgen, R.G., 2019. Genome-wide analysis of alternative splicing in *Zea mays* during maize Iranian mosaic virus infection. *Plant Mol. Biol. Rep.* 37: 413–420. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01169-y>
- Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., ... D'Eustachio, P. 2022. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>
- Grossmann, K., 2000. Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci.* 5: 506–508.
- Guo, L., Qiu, J., Ye, C., 2017. *Echinochloa crus-galli* genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed. *Nat Commun*, 8: 1031. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01067-5>.

- He, H.B., Wang, H.B., Fang, C.X., Lin, Z.H., Yu, Z.M., 2012. Separation of allelopathy from resource competition using rice/barnyardgrass mixed-cultures. *PLoS One*, 7: e37201.
- Heap, I., 2013 International survey of herbicide resistant weeds [Online]. Available: <http://www.weedscience.org>.
- Heap, I., 2022. The international herbicide-resistant weed database. Available online: <http://weedscience.org/Pages/Species.aspx>
- Howe, K.L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Barba, M., Bolser, D.M., Cambell, L., Carbajo, M., Chakiachvili, M., Christensen, M., Cummins, C., Cuzick, A., Davis, P., Fexova, S., Gall, A., George, N., Schuster, M., 2021. Ensembl Genomes: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
- Jin, W., Sun, J., Tang, W., Yang, Y., Zhang, J., Lu, Y., Yu, X., 2023. Comparative transcriptome analysis of the differential effects of florypyrauxifen-benzyl treatment on phytohormone transduction between florypyrauxifen-resistant and -susceptible barnyard grasses (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv). *Agronomy*, 13: 702. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030702>
- Juliano, L.M., Casimero, M.C., Llewellyn, R., 2010. Multiple herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in direct-seeded rice in the Philippines. *Int. J. Pest Manag.* 56: 299–307.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., Tanabe, M. 2021. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D545–D551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>
- Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z., Q., Liu, X.Q., Zhao, S.Q., Wei, L., Gao, G., 2007. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res.*, 35: W345–W349.
- Laloum, T., Martin, G., Duque, P., 2017. Alternative splicing control of abiotic stress responses. *Trends in Plant Sci.* 23 (2): 140–150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.019>
- Lam, P.Y., Wang, L., Lo, C., Zhu, F.Y. (2022). Alternative splicing and its roles in plant metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13): 7355. <https://doi.org/10.3390/ijms23137355>
- Lee, J.S., Gao, L., Guzman, L.M., Rieseberg, L.H., 2021. Genome-wide expression and alternative splicing in domesticated sunflowers (*Helianthus annuus* L.) under flooding stress. *Agronomy*, 11:92. doi: 10.3390/agronomy11010092.
- Li, L., & Howe, G.A. (2001). Alternative splicing of prosystemin pre-mRNA produces two isoforms that are active as signals in the wound response pathway. *Plant Molecular Biology*, 46(4): 409–419. <https://doi.org/10.1023/A:1010645330275>
- Liu, Z., Qin, J., Tian, X., 2018. Global profiling of alternative splicing landscape responsive to drought, heat and their combination in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.* 16: 714–726. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12822>
- Marquez, Y., Brown, J.W.S., Simpson, C., 2012. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Res.* 22: 1184–1195. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.134106.111>
- Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S.D., Chang, H.Y., El-Gebali, S., Fraser, M.I., Gough, J., Haft, D.R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., ... Finn, R.D. 2019. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>
- Nilsen, T.W. & Graveley, B.R., 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(7280): 457–463.
- Norsworthy, J.K., Wilson, M.J., Scott, R.C., Gbur, E.E., 2014. Herbicidal activity on acetolactate synthase-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas, USA. *Weed Biol. Manag.* 14: 50–58.
- Oerke, E.C. & Dehne, H.W., 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop. Prot.* 23: 275–285.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 40: 1413–1415. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.259>
- Powles, S.B. & Yu, Q., 2010. Evolution in action: plant resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 317–347.
- Shang, X., Cao, Y., Ma, L., 2017. Alternative splicing in plant genes: A means of regulating the environmental fitness of plants. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2): 432 DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18020432>
- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., 2012. Alternative splicing in plants-coming of age. *Trends Plant Sci.*, 17 (10): 616–623.
- Szakonyi, D., & Duque, P., 2018. Alternative splicing as a regulator of early plant development. *Front. Plant Sci.* 9:1174. doi: 10.3389/fpls.2018.01174.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2021. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 49(D1): D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Varshney, R.K., Nayak, S.N., May, G.D., Jackson, S.A., 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnol.* 27(9): 522–530.
- Wang, L., & Zhou, J., 2013. Splicing and alternative splicing in rice and humans. *BMB Rep.* 46: 439–447. doi: 10.5483/BMBRep.2013.46.9.161
- Yuan, J.S., Tranel, P.J., Stewart, C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12(1): 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.001>
- Zheng, Y., Wang, Y., Ding, B., Fei, Z., 2017. Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phasiRNAs and immune responses. *J. Virol.* 91(18): e00247-17 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00247-17>