

آنالیز مقایسه‌ای پروتئوم در بیوتیپ‌های حساس و مقاوم یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Durieu) به علف کش با استفاده از تکنیک iTRAQ

حسین ادیم^۱، لیلا فهمیده^{۲*}، براتعلی فاخری^۳، حمید نجفی زرینی^۴، حمیدرضا ساسان فر^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل و مربی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان شمالی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بجنورد، ۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۳- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ۴- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۵- استادیار بخش تحقیقات علف هرز، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۸)

چکیده

یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Durieu)، یکی از علف‌های هرز مشکل‌ساز برای بسیاری از محصولات زراعی و به‌خصوص گندم می‌باشد، اما کاربرد گسترده و مداوم علف‌کش‌ها، منجر به بروز مقاومت این علف هرز به علف‌کش‌ها در مناطق مختلف کشور شده است. این پژوهش با هدف آنالیز مقایسه‌ای پروتئوم بین بیوتیپ‌های حساس و مقاوم یولاف وحشی به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase و ALS با استفاده از طیف‌سنجی جرمی متوالی (MS/MS) و تکنیک iTRAQ انجام شد. نتایج این بررسی از نظر مقایسه پروتئین‌های افتراقی نشان داد که ۱۳۸ پروتئین در بیوتیپ مقاوم و ۹۳ پروتئین در بیوتیپ حساس دارای بیان افتراقی (DEPs) می‌باشند که براساس آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO)، در سه دسته اصلی شامل کارکردهای مولکولی (MF)، فرایندهای بیولوژیکی (BP) و اجزای سلولی (CC) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین آنالیز مسیرهای غنی‌سازی با استفاده از KEGG نشان داد که غنی‌ترین مسیرها شامل مسیرهای متابولیک، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و متابولیت‌های ثانویه بودند. در بیوتیپ مقاوم و در بین پروتئین‌های مسئول پاسخ دفاعی، سوپراکسید دیسموتاز (Q0DRV6) و در بین پروتئین‌های مسئول سم‌زدایی، سیتوکروم P450 (Q6YSB4) تنظیم افزایشی داشتند. پروتئین‌های اصلی درگیر در فرآیند فتوسنتز شامل psbA، psbD، psbB، psbC، psbD، psbE، psbF، psbG، psbH، psbI، psbJ، psbK، psbL، psbM، psbN، psbO، psbP، psbQ، psbR، psbS، psbT، psbU، psbV، psbW، psbX، psbY، psbZ، psbAA، psbAB، psbAC، psbAD، psbAE، psbAF، psbAG، psbAH، psbAI، psbAJ، psbAK، psbAL، psbAM، psbAN، psbAO، psbAP، psbAQ، psbAR، psbAS، psbAT، psbAU، psbAV، psbAW، psbAX، psbAY، psbAZ، psbBA، psbBB، psbBC، psbBD، psbBE، psbBF، psbBG، psbBH، psbBI، psbBJ، psbBK، psbBL، psbBM، psbBN، psbBO، psbBP، psbBQ، psbBR، psbBS، psbBT، psbBU، psbBV، psbBW، psbBX، psbBY، psbBZ، psbCA، psbCB، psbCC، psbCD، psbCE، psbCF، psbCG، psbCH، psbCI، psbCJ، psbCK، psbCL، psbCM، psbCN، psbCO، psbCP، psbCQ، psbCR، psbCS، psbCT، psbCU، psbCV، psbCW، psbCX، psbCY، psbCZ، psbDA، psbDB، psbDC، psbDD، psbDE، psbDF، psbDG، psbDH، psbDI، psbDJ، psbDK، psbDL، psbDM، psbDN، psbDO، psbDP، psbDQ، psbDR، psbDS، psbDT، psbDU، psbDV، psbDW، psbDX، psbDY، psbDZ، psbEA، psbEB، psbEC، psbED، psbEE، psbEF، psbEG، psbEH، psbEI، psbEJ، psbEK، psbEL، psbEM، psbEN، psbEO، psbEP، psbEQ، psbER، psbES، psbET، psbEU، psbEV، psbEW، psbEX، psbEY، psbEZ، psbFA، psbFB، psbFC، psbFD، psbFE، psbFF، psbFG، psbFH، psbFI، psbFJ، psbFK، psbFL، psbFM، psbFN، psbFO، psbFP، psbFQ، psbFR، psbFS، psbFT، psbFU، psbFV، psbFW، psbFX، psbFY، psbFZ، psbGA، psbGB، psbGC، psbGD، psbGE، psbGF، psbGG، psbGH، psbGI، psbGJ، psbGK، psbGL، psbGM، psbGN، psbGO، psbGP، psbGQ، psbGR، psbGS، psbGT، psbGU، psbGV، psbGW، psbGX، psbGY، psbGZ، psbHA، psbHB، psbHC، psbHD، psbHE، psbHF، psbHG، psbHH، psbHI، psbHJ، psbHK، psbHL، psbHM، psbHN، psbHO، psbHP، psbHQ، psbHR، psbHS، psbHT، psbHU، psbHV، psbHW، psbHX، psbHY، psbHZ، psbIA، psbIB، psbIC، psbID، psbIE، psbIF، psbIG، psbIH، psbIJ، psbIK، psbIL، psbIM، psbIN، psbIO، psbIP، psbIQ، psbIR، psbIS، psbIT، psbIU، psbIV، psbIW، psbIX، psbIY، psbIZ، psbJA، psbJB، psbJC، psbJD، psbJE، psbJF، psbJG، psbJH، psbJI، psbJJ، psbJK، psbJL، psbJM، psbJN، psbJO، psbJP، psbJQ، psbJR، psbJS، psbJT، psbJU، psbJV، psbJW، psbJX، psbJY، psbJZ، psbKA، psbKB، psbKC، psbKD، psbKE، psbKF، psbKG، psbKH، psbKI، psbKJ، psbKL، psbKM، psbKN، psbKO، psbKP، psbKQ، psbKR، psbKS، psbKT، psbKU، psbKV، psbKW، psbKX، psbKY، psbKZ، psbLA، psbLB، psbLC، psbLD، psbLE، psbLF، psbLG، psbLH، psbLI، psbLJ، psbLK، psbLM، psbLN، psbLO، psbLP، psbLQ، psbLR، psbLS، psbLT، psbLU، psbLV، psbLW، psbLX، psbLY، psbLZ، psbMA، psbMB، psbMC، psbMD، psbME، psbMF، psbMG، psbMH، psbMI، psbMJ، psbMK، psbML، psbMN، psbMO، psbMP، psbMQ، psbMR، psbMS، psbMT، psbMU، psbMV، psbMW، psbMX، psbMY، psbMZ، psbNA، psbNB، psbNC، psbND، psbNE، psbNF، psbNG، psbNH، psbNI، psbNJ، psbNK، psbNL، psbNM، psbNO، psbNP، psbNQ، psbNR، psbNS، psbNT، psbNU، psbNV، psbNW، psbNX، psbNY، psbNZ، psbOA، psbOB، psbOC، psbOD، psbOE، psbOF، psbOG، psbOH، psbOI، psbOJ، psbOK، psbOL، psbOM، psbON، psbOO، psbOP، psbOQ، psbOR، psbOS، psbOT، psbOU، psbOV، psbOW، psbOX، psbOY، psbOZ، psbPA، psbPB، psbPC، psbPD، psbPE، psbPF، psbPG، psbPH، psbPI، psbPJ، psbPK، psbPL، psbPM، psbPN، psbPO، psbPP، psbPQ، psbPR، psbPS، psbPT، psbPU، psbPV، psbPW، psbPX، psbPY، psbPZ، psbQA، psbQB، psbQC، psbQD، psbQE، psbQF، psbQG، psbQH، psbQI، psbQJ، psbQK، psbQL، psbQM، psbQN، psbQO، psbQP، psbQQ، psbQR، psbQS، psbQT، psbQU، psbQV، psbQW، psbQX، psbQY، psbQZ، psbRA، psbRB، psbRC، psbRD، psbRE، psbRF، psbRG، psbRH، psbRI، psbRJ، psbRK، psbRL، psbRM، psbRN، psbRO، psbRP، psbRQ، psbRR، psbRS، psbRT، psbRU، psbRV، psbRW، psbRX، psbRY، psbRZ، psbSA، psbSB، psbSC، psbSD، psbSE، psbSF، psbSG، psbSH، psbSI، psbSJ، psbSK، psbSL، psbSM، psbSN، psbSO، psbSP، psbSQ، psbSR، psbSS، psbST، psbSU، psbSV، psbSW، psbSX، psbSY، psbSZ، psbTA، psbTB، psbTC، psbTD، psbTE، psbTF، psbTG، psbTH، psbTI، psbTJ، psbTK، psbTL، psbTM، psbTN، psbTO، psbTP، psbTQ، psbTR، psbTS، psbTT، psbTU، psbTV، psbTW، psbTX، psbTY، psbTZ، psbUA، psbUB، psbUC، psbUD، psbUE، psbUF، psbUG، psbUH، psbUI، psbUJ، psbUK، psbUL، psbUM، psbUN، psbUO، psbUP، psbUQ، psbUR، psbUS، psbUT، psbUU، psbUV، psbUW، psbUX، psbUY، psbUZ، psbVA، psbVB، psbVC، psbVD، psbVE، psbVF، psbVG، psbVH، psbVI، psbVJ، psbVK، psbVL، psbVM، psbVN، psbVO، psbVP، psbVQ، psbVR، psbVS، psbVT، psbVU، psbVV، psbVW، psbVX، psbVY، psbVZ، psbWA، psbWB، psbWC، psbWD، psbWE، psbWF، psbWG، psbWH، psbWI، psbWJ، psbWK، psbWL، psbWM، psbWN، psbWO، psbWP، psbWQ، psbWR، psbWS، psbWT، psbWU، psbWV، psbWW، psbWX، psbWY، psbWZ، psbXA، psbXB، psbXC، psbXD، psbXE، psbXF، psbXG، psbXH، psbXI، psbXJ، psbXK، psbXL، psbXM، psbXN، psbXO، psbXP، psbXQ، psbXR، psbXS، psbXT، psbXU، psbXV، psbXW، psbXX، psbXY، psbXZ، psbYA، psbYB، psbYC، psbYD، psbYE، psbYF، psbYG، psbYH، psbYI، psbYJ، psbYK، psbYL، psbYM، psbYN، psbYO، psbYP، psbYQ، psbYR، psbYS، psbYT، psbYU، psbYV، psbYW، psbYX، psbYY، psbYZ، psbZA، psbZB، psbZC، psbZD، psbZE، psbZF، psbZG، psbZH، psbZI، psbZJ، psbZK، psbZL، psbZM، psbZN، psbZO، psbZP، psbZQ، psbZR، psbZS، psbZT، psbZU، psbZV، psbZW، psbZX، psbZY، psbZZ.

کلمات کلیدی: پروتئومیکس، مقاومت مبتنی بر جایگاه غیرهدف، هستی‌شناسی ژن.

Comparative analysis of proteome in herbicides susceptible and resistant winter wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu) biotypes using iTRAQ technique

Hossein Adim¹, Leila Fahmideh^{2*}, Barat Ali Fakheri³, Hamid Najafi Zarrini⁴, and Hamidreza Sasanfar⁵

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran and Instructor of Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Khorasan-e-Shomali (Bojnurd), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bojnurd, 2. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 3. Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, 4. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, 5. Department of Weed Research, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran.

(Received: January 16, 2021 - Accepted: February 26, 2021)

ABSTRACT

Winter wild oat is one of the most problematic weeds in many crops, especially wheat; however, the widespread and continuous application of herbicides has led to its resistance to herbicides in different parts of the country. This study was conducted to compare the proteome between susceptible and resistant biotypes of wild oats to ACCase and ALS inhibitors using Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and the iTRAQ techniques. The results of this study in terms of comparing the differential proteins identified 138 Proteins with Differential Expression (DEPs) in resistant biotypes and 93 DEPs in susceptible biotypes. Also, based on the results of Gene Ontology analysis (GO), proteins with differential expression under herbicide treatments in susceptible and resistant biotypes were classified in three main categories including molecular functions (MF), biological processes (BP) and cellular components (CC). Analysis of differential protein enrichment pathways using KEGG showed that the richest pathways included metabolic pathways, carbohydrate metabolism, and secondary metabolites. Among the proteins responsible for the defense response, superoxide dismutase (Q0DRV6) and among the proteins responsible for herbicide detoxification, cytochrome P450 (Q6YSB4) had up-regulation in resistant biotype. The major proteins involved in photosynthesis including petA, psaA, large RuBisCo subunit (rbcL), chlorophyll a and b and cytochrome b6 (petB) in the resistant biotype had down-regulated, while in the susceptible biotype, psaB, psaA, psbD, psbB and petB proteins had up-regulated. In addition, a salinity-related protein, such as Q6K4S7 protein, was up-regulated in resistant biotypes, and it appears that these proteins may play a role

*Corresponding author E-mail: l.fahmideh@gau.ac.ir

in herbicide resistance.

Keywords: Gene Ontology, NTSR, Proteomics.

مقدمه

اصلی، تحت عنوان مقاومت مبتنی بر جایگاه هدف (TSR) و مقاومت مبتنی بر جایگاه غیر هدف^۴ (NTSR) تقسیم شود (Fang et al., 2019; Beckie, 2020). مقاومت مبتنی بر جایگاه هدف (TSR)، عموماً هنگامی رخ می‌دهد که تغییر یک اسید آمینه، به واسطه جهش ژنتیکی در ژن کدکننده آنزیم در جایگاه هدف، منجر به کاهش تمایل اتصال علف‌کش به آن می‌شود (Fang et al., 2019). موارد متعددی از این نوع مقاومت که به وسیله جهش نقطه‌ای ایجاد می‌شود مطالعه شده است. برای مثال، جهش‌های نقطه‌ای در ژن استولاکتات سینتاز (ALS) منجر به ایجاد مقاومت در گونه‌های زیادی از علف‌های هرز شده است (Tranel et al., 2015). همچنین وقوع جهش نقطه‌ای Cys2088Arg در چچم (*Lolium multiflorum* Lam) مقاومت به همه خانواده‌های علف‌کشی ACCase را ایجاد می‌نماید. نوع دیگری از مقاومت مبتنی بر جایگاه هدف، از طریق افزایش بیان محل هدف و تولید مازاد در پروتئین متصل به علف‌کش به دست می‌آید (Preston et al., 2001). برای مثال در تاج خروس (*Amaranthus palmeri*) مقاوم، تعداد نسخه‌های ژن EPSPS بین پنج تا ۱۶۰ برابر نوع حساس آن می‌باشد (Gaines et al., 2020). مقاومت مبتنی بر جایگاه غیر هدف (NTSR)، عموماً یک صفت پیچیده است که توسط انواعی از سازوکارها همچون افزایش سرعت متابولیسم علف‌کش، کاهش جذب یا انتقال، جبران^۵ و یا تغییر در شبکه دفاعی عمومی در مقابل تنش به دست می‌آید (Powles & Yu, 2010). تاکنون چهار خانواده ژنی

علف‌کش‌ها از اواخر دهه ۱۹۴۰ برای کنترل علف‌های هرز در مقیاس جهانی به کار رفته‌اند و همچنان نیز یکی از اجزای اصلی مدیریت علف‌های هرز در بوم نظام‌های زراعی محسوب می‌شوند (Zand et al., 2009a; Gharekhaloo et al., 2016). با این وجود، مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز که در اثر فشار انتخابی شدید توسط کاربرد مداوم علف‌کش‌ها اعمال می‌شود، در حال تبدیل شدن به یک مشکل جهانی می‌باشد (Gaines et al., 2020).

یولاف وحشی زمستانه (*A. ludoviciana* Durieu) یکی از علف‌های هرز باریک‌برگ با قدرت رقابتی بالا در محصولات زراعی به‌ویژه گندم محسوب می‌شود و تلفات عملکرد ناشی از رقابت آن در گندم تا ۷۰ درصد گزارش شده است (Jäck et al., 2017). کاربرد گسترده علف‌کش‌ها از جمله علف‌کش‌های بازدارنده استیل-کوآنزیم آ کربوکسیلاز^۱ (ACCase) و استولاکتات سینتاز^۲ (ALS)، منجر به ظهور و توسعه بیوتیپ‌های مقاوم در یولاف وحشی شده است، به طوری که به عنوان یکی از ۱۵ علف هرز مهم مقاوم به علف‌کش در سراسر دنیا مطرح می‌باشد (Heap, 2020). در ایران نیز زند و همکاران (Zand et al., 2006; Zand et al., 2009b) مقاومت علف‌های هرز باریک‌برگ مانند یولاف وحشی (*A. ludoviciana* Dur.)، خونی واش (*Phalaris minor* Retz.)، *P. paradoxa* L.) و چچم (*Lolium rigidum* Gaud.) به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در مزارع گندم را گزارش کردند. مقاومت از طریق سازوکارهای مختلفی ایجاد می‌شود که به دو دسته

⁴ -Non-target-site resistance (NTSR)

⁵ - Compensation

⁶ - Sequestration

¹ - Acetyl-CoA carboxylase (ACC)

² - Acetolactate synthase (ALS)

³ - Targetsite resistance (TSR)

مبانی مولکولی مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز با استفاده از تکنولوژی‌هایی همانند PCR-RFLP؛ CAPS؛ dCAPS^۷ و پاسا^۸ و واکنش بسط پرایمر (SNaPshot)^۹ انجام شده است (Délye, 2013; Marshall *et al.*, 2013). اما شناسایی ژن‌های اعطا کننده NTSR و کارکرد آن‌ها در ایجاد مقاومت، به دلیل مکانیسم‌های متنوع درگیر در آن، زمان‌بر و مشکل می‌باشد؛ بنابراین استفاده از شیوه‌های آزمایشگاهی با توان عملیاتی بالا مانند فن‌آوری توالی‌یابی کامل ترانسکریپتوم^{۱۰} و یا آنالیز پروتئوم می‌تواند به بررسی این نوع از مقاومت کمک نماید (Salas-Perez *et al.*, 2018; Piasecki *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

برخلاف پروفایل ترانسکریپتوم که دارای محدودیت‌هایی همچون نداشتن همبستگی بین سطح mRNA با پروتئین‌های مرتبط با خود که عمدتاً به دلیل تنظیم‌های پس از نسخه برداری می‌باشد، آنالیز پروتئوم راهبرد پایداری است که تغییرات پویا در فراوانی پروتئین‌ها و به‌خصوص پروتئین‌های با بیان پایین را نشان می‌دهد (Maroli *et al.*, 2018). پروتئومیکس مقایسه‌ای توسط تکنیک‌های مختلف زیادی انجام می‌شود؛ یکی از این تکنیک‌ها که به‌خصوص در بررسی انواع تنش‌های محیطی بر روی گیاهان بسیار مورد توجه واقع شده است، iTRAQ^{۱۱} می‌باشد (Su *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

این روش در مقایسه با شیوه‌های مبتنی بر ژل همچون 2DE (O'Farrell, 1975) و ICAT^{۱۲} (Gygi *et al.*,

شامل سیتوکروم P450s، گلوکاتایون-اس-ترانسفراز (GSTs)، انتقال دهنده ABC و گلیکوزیل ترانسفراز نشان داده‌اند که نقش اصلی را در پاسخ به علف‌کش‌ها و مقاومت NTSR دارند (Nandula *et al.*, 2019; Dimaano & Iwakami, 2020).

مقاومت NTSR به‌خصوص اگر شامل سم‌زدایی علف‌کش از طریق آنزیم‌ها باشد، توسط تعداد زیادی از ژن‌ها کنترل می‌شود (پلی‌ژنیک)^۱ و ممکن است مقاومت به علف‌کش‌هایی با نحوه عمل کاملاً متفاوت را ایجاد نماید (Preston, 2003). اگرچه مقاومت NTSR با توارث تک ژنی (مونوژنیک)^۲ نیز در تعدادی از علف‌های هرز مقاوم همانند تاج خروس (*Amaranthus tuberculatus*) گزارش شده است (Huffman *et al.*, 2015)، با این وجود، اغلب سازوکارهای ژنتیکی مربوط به این نوع از مقاومت هنوز ناشناخته است و استفاده از تکنولوژی امیکس برای مطالعه آن‌ها بسیار امیدبخش است (Maroli *et al.*, 2018). پلتفورم‌های مختلف امیکس همچون ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس، قابلیت زیادی در دانستن سازوکارهای مقاومت به علف‌کش‌ها دارند. این موضوع به‌خصوص در بررسی مقاومت چندگانه در گیاهان پلی‌پلوئید مانند یولاف که دارای ژنوم هگزاپلوئید است و جهش‌ها (به‌عنوان مثال در ژن ACCase) به‌طور مستقل از هم تفکیک شده‌اند و هر آلل، سطح مشخصی از مقاومت را اعطا می‌کند^۳، اهمیت بیشتری دارد (Gaines *et al.*, 2020).

در طول دو دهه گذشته، تلاش‌های زیادی برای شناخت

⁷ - Polymerase chain reaction (PCR) allele specific assay (PASA)

⁸ - Primer extension reaction (SNaPshot)

^۹ - RNA-sequencing (RNA-seq)

^{۱۰} - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation

^{۱۱} - Isotope-coded affinity tags

¹ - Polygenic

² - Monogenic

³ - Allele dosage

⁴ - PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

⁵ - Cleaved amplified polymorphic sequence

⁶ - Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS)

مسئول ایجاد مقاومت متابولیکی با استفاده از تکنیک iTRAQ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه و اعمال تیمارهای علف‌کش
 بررسی‌های گلخانه‌ای این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی
 بخش تحقیقات علف‌های هرز در موسسه تحقیقات
 گیاهپزشکی کشور در سال ۱۳۹۷ انجام شد. در این
 بررسی، از بذره‌های مربوط به دو بیوتیپ یولاف وحشی
 زمستانه، یک بیوتیپ با سابقه مقاومت چندگانه به
 علف‌کش‌های بازدارنده ACCase و ALS (R) که
 مقاومت آن در بررسی‌های قبلی به اثبات رسیده بود
 (Jomi, 2020) و یک بیوتیپ حساس (S) که از حاشیه
 مزارع جمع‌آوری شده بود، استفاده شد. به این منظور،
 ابتدا بذره‌های یولاف در محلول هیپوکریت سدیم پنج
 درصد استریل شدند و پس از رفع خواب (پوست‌کنی
 و سرمادهی مرطوب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد
 به مدت یک هفته)، شش بذر در گلدان‌های نیم لیتری
 کشت شدند و در گلخانه با دوره نوری ۱۶ ساعت
 روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۱۵ درجه
 سانتی‌گراد نگهداری شدند (Shukla et al., 1997). پس
 از حدود سه هفته، گیاهچه‌ها در مرحله دو تا سه برگه،
 با مقادیر توصیه شده علف‌کش‌های
 کلودینافوپ پروپارزیل (بازدارنده ACCase) و
 یدوسولفورون متیل سدیم + مزوسولفورون متیل
 (بازدارنده ALS)، به ترتیب به میزان یک و ۱/۵ لیتر در
 هکتار تیمار شدند (سمپاشی هر علف‌کش به صورت
 جداگانه و با رعایت حداقل فاصله زمانی ممکن انجام
 شد). همچنین برای هر بیوتیپ، گلدان‌های شاهد بدون
 سمپاشی نیز در نظر گرفته شد. به‌طورکلی دو بیوتیپ
 حساس و مقاوم یولاف هر کدام تحت دو شرایط تیمار
 سم پاشی و بدون سم پاشی با دو تکرار بیولوژیک مورد

(1999) و DIGE^۱ (Hamdan & Righetti, 2002; Patton, 2002)، تکرار پذیری بالاتر، حساسیت بیشتر و کاربرد وسیعی در تحقیقات پروتئومیکس دارد. تاکنون از این شیوه برای ارزیابی رشد و توسعه محصول و سازوکارهای مولکولی مرتبط با پاسخ‌های هورمونی و تنش‌ها در محصولات مختلفی همچون گندم (*Triticum aestivum*) (Ma et al., 2014)، برنج (*Oryza sativa*) (Dong et al., 2014)، ذرت (*Zea mays*) (Yu et al., 2015)، سویا (*Glycine max*) (Qin et al., 2013)، کلزا (*Brassica napus*) (Chu et al., 2015) و پنبه (*Gossypium hirsutum*) (Fan et al., 2014) استفاده شده است. در سال‌های اخیر نیز تکنیک iTRAQ برای بررسی سازوکارهای مولکولی مرتبط با مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها به کار رفته است (Pan et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2017).

با توجه به این‌که گسترش بیوتیپ‌های مقاوم می‌تواند با سرعت زیادی رخ دهد، بنابراین هزینه اعمال شده ناشی از خسارت آن بسیار بالا برآورد می‌شود. بر این اساس، تشخیص دقیق و جامع جنبه‌های مختلف مکانیسم‌های ایجاد کننده مقاومت به‌منظور پایش و مدیریت این پدیده بسیار ضروری است. در این خصوص، یکی از کاربردهای شاخه‌های مختلف امیکس در کشاورزی، بررسی جنبه‌های مولکولی و بیوشیمیایی تکامل مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز و تعیین ژن‌های درگیر در آن به منظور ایجاد شیوه‌های مدیریتی مناسب برای غلبه بر آن می‌باشد. با توجه به این‌که دانسته‌های ما در مورد سازوکارهای مقاومت چندگانه مبتنی بر جایگاه غیر هدف بسیار اندک است، این بررسی برای اولین بار در یولاف وحشی زمستانه و با هدف شناسایی پروتئین‌های

^۱ Differential gel electrophoresis

میکروگرم پپتید از هر نمونه هضم شده با استفاده از معرف هشت‌تایی iTRAQ به‌صورت زیر برچسب گذاری شد:

نمونه‌های تیمار نشده حساس (SC-1, SC-2) با برچسب‌های ۱۱۳ و ۱۱۴، نمونه‌های حساس تیمار شده با علف‌کش (ST-1, ST-2) با برچسب‌های ۱۱۵ و ۱۱۶، نمونه‌های مقاوم تیمار نشده (RC-1, RC-2) با برچسب‌های ۱۱۷ و ۱۱۸ و نمونه‌های مقاوم تیمار شده (RT-1, RT-2) با برچسب‌های ۱۱۹ و ۱۲۱ شماره-گذاری شدند. به‌طورکلی در این بررسی در دو بیوتیپ حساس و مقاوم یولاف، هر کدام با سم پاشی و بدون سم پاشی، دو تکرار بیولوژیک در نظر گرفته شد که مجموعاً شامل هشت نمونه بود و توسط کیت هشت تایی iTRAQ 8-plex برچسب‌گذاری شدند. لازم به توضیح است که معرف هشت‌تایی iTRAQ شامل هشت معرف هم‌بار (113, 114, 115, 116, 117, 119, 120, 121) به‌صورت دالتون می‌باشند.

کروماتوگرافی تبادل کاتیونی (SCX)

پس از برچسب زدن، هر هشت نمونه با مقادیر مساوی مخلوط شدند و پس از آن جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی (SCX) انجام شد (Manadas *et al.*, 2010). به این منظور، از ستون تبادل کاتیونی LC-20AB HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) A (25 mM و بافرهای NaH₂PO₄ in 25% ACN, pH 3. 0) B (25 mM و NaH₂PO₄, 1 M KCl in 25% ACN, pH 3. 0) استفاده شد.

آنالیز طیف‌سنجی جرمی (LC-MS/MS)

به‌منظور طیف‌سنجی جرمی، هشت نمونه مورد نظر پس از برچسب‌دار نمودن با یکدیگر مخلوط شد و در یک

بررسی قرار گرفتند. تقریباً ۲۴ ساعت پس از سمپاشی، نمونه‌های برگ از گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد (تیمار نشده) برداشت شدند و پس از قرار دادن در نیتروژن مایع در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Yang *et al.*, 2017) و تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در همین دما نگهداری شدند.

استخراج پروتئین

پس از اعمال تیمارهای علف‌کش و نمونه‌برداری، پروتئین تام^۱ از گیاهچه‌های تیمار شده و نشده شامل برگ و ساقه در بیوتیپ‌های حساس و مقاوم یولاف استخراج شد. برای استخراج پروتئین برگ از روش TCA/acetone (Méchín *et al.*, 2007) و همچنین برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

احیا^۲، آلکیلاسیون^۳ و برچسب‌گذاری iTRAQ^۵ پروتکل iTRAQ به‌طورکلی شامل مراحل احیا، آلکیلاسیون و هضم نمونه‌های پروتئینی قبل از برچسب‌دار کردن آن‌ها می‌باشد. احیا و آلکیلاسیون، باعث مسدود کردن هر گونه واکنش بین معرف‌های استفاده شده با ریشه‌های سیستمین می‌شود. احیای نمونه‌ها به‌وسیله اضافه کردن Dithiothreitol (DTT) و پس از آن آلکیلاسیون سیستمین به‌وسیله اضافه کردن یدواستامید^۶ به‌منظور تغییر کووالانسی گروه‌های سیستمین و جلوگیری از تشکیل اتصالات جدید انجام شد (Suttapitugsakul *et al.*, 2017). در نهایت، هضم آنزیمی شبانه^۷ از طریق اضافه کردن تریپسین با نسبت (۱:۵۰) انجام شد. پس از آماده سازی اولیه نمونه‌ها، برچسب‌زنی با استفاده از کیت iTRAQ 8-plex kits (AB Sciex, USA) و بر اساس راهنمای شرکت سازنده آن انجام شد. به این منظور، تقریباً ۱۰۰

^۵- iTRAQ Labeling

^۶- Iodoacetamide (IAA)

^۷- Overnight

^۱ - Total Protein

^۲- Reduction

^۳- Alkylation

^۴- Digestion

مقاوم، ۱۳۸ پروتئین با بیان افتراقی DEPs وجود دارد که در آن ۶۸ پروتئین، تنظیم افزایشی و ۷۰ پروتئین، تنظیم کاهشی نشان دادند. همچنین به‌طور کلی در بیوتیپ حساس، ۹۳ پروتئین DEPs شناسایی شد که ۴۷ پروتئین، تنظیم افزایشی و ۴۶ پروتئین، تنظیم کاهشی داشتند (شکل ۱).

آنالیز هستی‌شناسی GO و KEGG

آنالیز هستی‌شناسی (GO) پروتئین‌های دارای بیان افتراقی تحت تیمارهای علف‌کش، در بیوتیپ حساس و مقاوم در سه دسته اصلی شامل کارکردهای مولکولی (MF)، فرایندهای بیولوژیکی (BP) و اجزای سلولی (CC) انجام شد (شکل ۲). نتایج آنالیز هستی‌شناسی نشان داد که در دسته فرایندهای بیولوژیکی، بیشترین واژه‌های GO غنی‌شده مربوط به فرایندهای سلول (GO:0009987)، متابولیک سلولی

(GO:0044237) و متابولیک (GO:0008152) بودند. در دسته مربوط به کارکردهای مولکولی، بیشترین واژه‌های GO غنی شده شامل فعالیت‌های کاتابولیک (GO:0003824) و اکسید و احیا (GO:0016491)، اتصالات یونی (GO:0043167) و اتصالات (GO:0005488) و در دسته اجزای سلولی شامل سلول (GO:0005623) و سیتوپلاسم (GO:0005737) بودند.

همچنین آنالیز مسیرهای غنی‌سازی پروتئین‌های افتراقی با استفاده از KEGG نشان داد که غنی‌ترین مسیرها شامل مسیرهای متابولیک، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و متابولیت‌های ثانویه بودند (شکل ۳).

پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، پروتئین P0C512 مربوط به زیرواحد بزرگ آنزیم رایسکو در بیوتیپ مقاوم، تنظیم کاهشی داشت (جدول ۱) که حاکی از کاهش تثبیت CO₂ تحت شرایط تنش علف‌کش است. تنش اکسیداتیو القا شده ناشی از انواع تنش‌های

میکرو تیوپ دو میلی لیتری به کشور کانادا ارسال شدند. به منظور طیف‌سنجی جرمی متوالی MS/MS از طیف سنج TripleTOF 6600 (ABSciex, Foster City, CA, USA) کوپل شده با Eksigent μ UHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA) مجهز به نرم افزار Analyst® TF 1.8 استفاده شد. ولتاژ منبع ۵/۵ کیلو ولت در ۳۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و سپس پنج میکرولیتر از محلول پپتید در ستون C18 به‌عنوان ستون تله به‌منظور نمک‌زدایی و تغلیظ بارگذاری شد. ستون C18 دارای قطر درونی ۰/۳ میکرومتر، اندازه ذرات ۲/۶ میکرومتر و طول ۱۵۰ میلی متر بود.

شناسایی و کمی‌سازی پروتئین‌ها

برای شناسایی و کمی‌سازی پپتیدها از نرم افزار پروتئین پایلوت ProteinPilot 5.0 (Sciex, US) و الگوریتم پاراگون استفاده شد. جستجوی پروتئین‌ها در پایگاه برنج UniProt-Rice_UP000059680 (48,903 entries, 24 August 2020) پس از شناسایی پروتئین‌ها برای دسته بندی و شرح‌نگاری^۱ آن‌ها از پایگاه‌های اطلاعاتی زیر استفاده شد:

<http://pfam.xfam.org>
<http://www.genome.jp/kegg/>
<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>
<http://www.geneontology.org>

نتایج و بحث

بر اساس نتایج، پروتئین‌های موجود در بیوتیپ‌های مقاوم و حساس یولاف وحشی به علف‌کش‌های مورد آزمایش شناسایی شد که در ادامه فهرست پروتئین‌های شناسایی شده در بیوتیپ یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش در جدول ۱ و فهرست پروتئین‌های شناسایی شده در بیوتیپ یولاف وحشی حساس به علف‌کش در جدول ۲ آورده شده است.

مقایسه پروتئین‌های افتراقی با استفاده از نمودار ون^۲ مقایسه پروتئین‌های افتراقی نشان داد که در بیوتیپ

^۲- Venn diagram

^۱- Annotations

غیرزیستی همچون علف‌کش‌ها، از طریق تولید انواع اکسیژن فعال و اختلال در نقل و انتقال الکترون، باعث آسیب و تخریب سلول‌ها و اختلال در فعالیت‌های

جدول ۱- فهرست پروتئین‌های شناسایی شده در بیوتیپ مقاوم یولاف وحشی زمستانه در پاسخ به علف‌کش‌های مورد آزمایش.

Table 1. Proteins identified in the resistant winter wild oat biotype in response to the studied herbicides.

Protein ID ¹	Description ²	logFC	Status	P. Value
A0A0N7KEW6		4.12	UP	0.001288
Q6ZJI2	protein DETOXIFICATION 33 (LOC4346253)	3.03	UP	0.015898
Q9XHY6		2.96	UP	0.038145
Q7XR46	probable polyamine oxidase 2 (LOC4337359)	2.85	UP	0.155507
A0A0P0XPK5		2.70	UP	0.193855
Q7XGX7		2.36	UP	0.035
Q6YU35	uncharacterized LOC4342911 (LOC4342911)	2.21	UP	0.118967
Q67UK0		2.06	UP	0.075196
Q5N747		1.77	UP	0.000563
A0A0P0XPM4		1.54	UP	0.010764
Q94IZ7	RING-H2 finger protein ATL46 (LOC4325572)	1.46	UP	0.051493
C7J5G2		1.42	UP	0.059112
B9FJU1		1.37	UP	0.019878
Q64M88	protein PAT1 homolog 1 (LOC4329480)	1.34	UP	0.094211
Q0JL46	neutral ceramidase (LOC4326680)	1.31	UP	0.007751
A0A0P0VK87		1.21	UP	0.049347
Q6AUN4	uncharacterized LOC4339652 (LOC4339652)	1.19	UP	0.075245
Q9SXP2	formate dehydrogenase 1, mitochondrial (LOC4341069)	1.13	UP	0.262797
B9FBM2	uncharacterized LOC9266492 (LOC9266492)	1.09	UP	0.010386
Q10Q21	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta (LOC4332040)	1.09	UP	0.206695
Q67VA4	protease Do-like 9 (LOC4340589)	1.09	UP	0.011508
Q6EPY3	uncharacterized protein At2g27730, mitochondrial (LOC4329559)	1.04	UP	0.01155
Q657T1		1.04	UP	0.080449
Q6K4Q4		1.04	UP	0.009967
A0A0P0XJZ6		1.01	UP	0.006625
Q6Z130	putative deoxyribonuclease TATDN1 (LOC4342437)	1.01	UP	0.374367
A0A0P0VBT0		1.00	UP	0.070814
A0A0N7KQS6	transcription factor TEOSINTE BRANCHED 1 (LOC4347031)	0.99	UP	0.160262
Q6ZDM1	putative lipase YOR059C (LOC4344647)	0.97	UP	0.128065
Q53KJ5	cyanidin 3-O-rutinoside 5-O-glucosyltransferase-like (LOC107276133)	0.96	UP	0.236316
A0A0P0V526		0.95	UP	0.060114
Q84Q84	RNA polymerase sigma factor sigB (LOC4332388)	0.94	UP	0.00949
A0A0P0VAM2		0.94	UP	0.044593
Q6YSB4	cytochrome P450 76M5-like (LOC4345786)	0.92	UP	0.388817
Q6H8H3	50S ribosomal protein L19-2, chloroplastic (LOC9272428)	0.92	UP	0.023598
Q84P96	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (LOC4331150)	0.92	UP	0.00784
A0A0N7KIQ8		0.91	UP	0.154466
Q0J9W0		0.88	UP	0.028035
Q850Z0	uncharacterized LOC4334664 (LOC4334664)	0.85	UP	0.026467

² -Description, annotated biological functions based on Gene Ontology (GO) analysis

¹ -Protein ID, unique protein identifying number in the UniProt database

Q9S7D3	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 1, mitochondrial (LOC4344541)	0.84	UP	0.101833
A0A0P0VD50		0.84	UP	0.099952
Q75LD5	probable ion channel CASTOR (LOC4334751)	0.81	UP	0.011626
Q5SN38	putative uncharacterized protein DDB_G0277255 (LOC4327865)	0.80	UP	0.067657
Q7XV14	glutamate decarboxylase (LOC4335973)	0.79	UP	0.013299
Q0DRV6	superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 (LOC4332846)	0.78	UP	0.183297
Q69NN6	mechanosensitive ion channel protein 10 (LOC4340431)	0.77	UP	0.089015
Q5JLV2	uncharacterized LOC4324965 (LOC4324965)	0.76	UP	0.036035
Q7XDQ8	short-chain type dehydrogenase/reductase (LOC4348791)	0.76	UP	0.003872
B7F9F7	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230 (LOC4341238)	0.75	UP	0.0353
Q10EK0	BTB/POZ domain-containing protein At5g66560 (LOC4334235)	0.75	UP	0.097217
A0A0P0VBA3	uncharacterized LOC9268172 (LOC9268172)	0.73	UP	0.198063
Q6ZHP6	outer envelope membrane protein 7 (LOC4330521)	0.71	UP	0.148703
Q8RZQ6	scarecrow-like protein 1 (LOC4324850)	0.70	UP	0.017096
Q5N861	sister chromatid cohesion 1 protein 4 (LOC4325108)	0.70	UP	0.036439
A0A0P0Y5T7		0.70	UP	0.03406
Q6K4S7	salt stress root protein RS1-like (LOC4329036)	0.70	UP	0.03291
Q8RZU9	small ubiquitin-related modifier 1-like (LOC4324359)	0.69	UP	0.004759
Q7Y140	calreticulin-like (LOC4334675)	0.68	UP	0.011478
Q69TN4	two pore potassium channel c (LOC4346662)	0.68	UP	0.052237
Q0D3X3		0.66	UP	0.00941
Q69UZ3	ion protease homolog, mitochondrial (LOC9270304)	0.65	UP	0.02931
Q7GD79	GTP-binding nuclear protein Ran-2 (LOC4339683)	0.65	UP	0.036589
O22386	50S ribosomal protein L12, chloroplastic (LOC9271252)	0.64	UP	0.061665
Q5NAI9	WD-40 repeat-containing protein MSI4 (LOC4327826)	0.62	UP	0.130295
A0A0P0XW06		0.62	UP	0.572577
Q0DJE6		0.62	UP	0.283617
A0A0P0W2T4		0.61	UP	0.42675
Q69K00	triosephosphate isomerase, chloroplastic (LOC4347691)	-0.60	Down	0.006276
P0C389	apocytochrome f precursor (petA)	-0.60	Down	0.028951
Q8S7M7	plant intracellular Ras-group-related LRR protein 5 (LOC4349464)	-0.61	Down	0.021877
Q6YU90	glycerate dehydrogenase (LOC4327981)	-0.62	Down	0.018511
A0A0P0X037		-0.62	Down	0.230378
A0A0P0XHK0		-0.62	Down	0.028427
Q10CE4	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1 (LOC4334349)	-0.63	Down	0.066634
Q69IM3	ATPase family AAA domain- containing protein At1g05910 (LOC4347572)	-0.63	Down	0.177076
Q6K471	ferredoxin-thioredoxin reductase catalytic chain, chloroplastic (LOC4346508)	-0.63	Down	0.019311
Q0D8X7	uncharacterized LOC4342281 (LOC4342281)	-0.64	Down	0.173167
Q6YWJ7	chlorophyll a-b binding protein P4,	-0.64	Down	0.080515

Q67UJ6	chloroplastic (LOC4345663) type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 10 (LOC4340527)	-0.65	Down	0.014986
A0A0P0W0Y8		-0.65	Down	0.539758
POC355	PSI P700 apoprotein A1 (psaA)	-0.66	Down	0.226354
POC512	RuBisCO large subunit (rbcL)	-0.66	Down	0.043251
POC5D6	serine/threonine-protein kinase SAPK3 (LOC4349411)	-0.67	Down	0.048797
Q0JHF8	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (LOC4325071)	-0.67	Down	0.031278
A0A0P0V9Q3	cation/H(+) antiporter 15 (LOC4327491)	-0.68	Down	0.025341
Q6K680	probable steroid-binding protein 3 (LOC4330990)	-0.68	Down	0.260422
Q6YXC6	cingulin-like protein 1 (LOC4329734)	-0.69	Down	0.044756
Q7X8R5	thioredoxin M2, chloroplastic (LOC4336484)	-0.69	Down	0.073453
Q7XZX4	40S ribosomal protein S29 (LOC4350976)	-0.69	Down	0.029327
A0A0P0Y632		-0.70	Down	0.693962
Q9AUK4	magnesium transporter MRS2-A, chloroplastic (LOC4333741)	-0.70	Down	0.027556
P48494	triosephosphate isomerase, cytosolic (LOC4325211)	-0.70	Down	0.017841
A0A0P0W473		-0.70	Down	0.428128
Q6ZJJ1	probable L-ascorbate peroxidase 4 (LOC4346247)	-0.70	Down	0.065065
A0A0P0WUJ3	protein ALTERED XYLOGLUCAN 4-like (LOC107278309)	-0.71	Down	0.041286
A0A0P0V0K3		-0.72	Down	0.06432
TRYP_PIG		-0.72	Down	0.170267
P14717	phenylalanine ammonia-lyase (LOC4330034)	-0.73	Down	0.015036
Q337X1	TATA-binding protein 2-like (LOC4348699)	-0.73	Down	0.00892
Q8W0G9	pentatricopeptide repeat-containing protein At3g09060 (LOC4324816)	-0.74	Down	0.024681
Q69JE7		-0.74	Down	0.038523
Q0IZB0		-0.75	Down	0.085161
Q7XN85	ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic (LOC4337267)	-0.76	Down	0.013156
P12123	cytochrome b6(petB)	-0.77	Down	0.071917
Q8HCR5	hypothetical protein (orf25) dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 3 of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (LOC4339859)	-0.77	Down	0.312615
Q5VS74		-0.79	Down	0.574291
Q0IUH4		-0.79	Down	0.016472
Q7XWU3	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 6 (LOC4335223)	-0.79	Down	0.010236
A0A0N7KKT2		-0.80	Down	0.028858
A0A0P0XFI7		-0.81	Down	0.074366
Q6K8R8		-0.81	Down	0.076727
A0A0P0VHU3		-0.81	Down	0.031692
P42211	aspartic proteinase-like (LOC4337744)	-0.81	Down	0.131102
Q0IM44	uncharacterized LOC4352714 (LOC4352714)	-0.86	Down	0.074121
Q7X6B1	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha- mannosidase MNS1 (LOC4336917)	-0.88	Down	0.034596
A0A0N7KU56		-0.90	Down	0.051463
A0A0P0VBL9		-0.91	Down	0.020294
Q69M23	peroxisome biogenesis protein 3-1 (LOC4346691)	-0.91	Down	0.012735
Q0J4T9		-0.92	Down	0.007738
A0A0N7KD33		-0.93	Down	0.049511
Q7XXS4	thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic (LOC4343443)	-0.93	Down	0.002733
Q84MV1	Pectinesterase (LOC4333049)	-0.96	Down	0.021534
Q656A8	U-box domain-containing protein 20- like (LOC107275483)	-0.97	Down	0.192866

Q60E66	UDP-sulfoquinovose synthase, chloroplastic (LOC4338660)	-0.98	Down	0.271145
Q9SDG5	isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial (LOC4324442)	-1.07	Down	0.248788
A0A0P0VUD4		-1.09	Down	0.170895
Q69UU3	glutamate--glyoxylate aminotransferase 2 (LOC4342210)	-1.09	Down	0.002031
Q9SDD6	peroxiredoxin-2F, mitochondrial (LOC4324376)	-1.12	Down	0.011831
Q5N7X2	uncharacterized LOC4324318 (LOC4324318)	-1.14	Down	0.107272
Q7XTH0	7-deoxyloganetin glucosyltransferase (LOC4335470)	-1.19	Down	0.684666
Q10KN9	KH domain-containing protein At4g18375 (LOC4332959)	-1.21	Down	0.063176
A0A0N7KS21	probable plastid-lipid-associated protein 10, chloroplastic (LOC4349082)	-1.23	Down	0.207937
Q6KAJ1	classical arabinogalactan protein 9 (LOC4331018)	-1.44	Down	0.005681
THIO_HUMAN		-1.59	Down	0.135557
Q653S6	uncharacterized LOC4347841 (LOC4347841)	-2.40	Down	0.112575
P17070	proliferating cell nuclear antigen (LOC4331062)	-2.67	Down	0.01986
Q6ZL23		-3.02	Down	0.004939

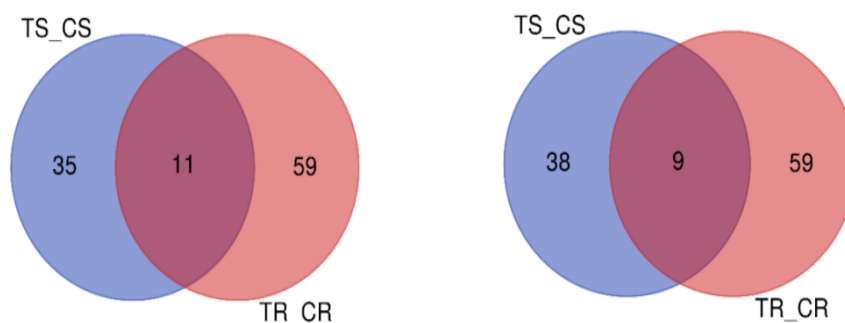
جدول ۲- فهرست پروتئین‌های شناسایی شده در بیوتیپ حساس یولاف وحشی زمستانه در پاسخ به علف‌کش‌های آزمایش.

Table 2. Proteins identified in the susceptible winter wild oat biotype in response to the studied herbicides.

Protein ID	Description	logFC	Status	P. Value
Q5N8G1	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, chloroplastic (LOC9266653)	3.0805713	UP	0.075938
A0A0P0VU93		2.27404195	UP	0.479254
Q0DJE6		1.64284341	UP	0.018477
Q5N747		1.60153386	UP	0.000987
A0A0P0V4B7		1.52084113	UP	0.00109
A0A0P0XFT8		1.43054515	UP	0.288275
A0A0N7KS21	probable plastid-lipid-associated protein 10, chloroplastic (LOC4349082)	1.38505158	UP	0.163388
Q9XHY6		1.22969156	UP	0.320702
Q6Z6B5	fruit protein pKIWI502 (LOC4329197)	1.18628767	UP	0.069041
Q653S6	uncharacterized LOC4347841 (LOC4347841)	1.1354765	UP	0.417679
Q2R1V8	GDP-mannose 3,5-epimerase 2 (LOC4350816)	1.04472953	UP	0.290316
Q60E66	UDP-sulfoquinovose synthase, chloroplastic (LOC4338660)	1.01054566	UP	0.259688
P35684	60S ribosomal protein L3 (LOC4351604)	0.96390122	UP	0.10054
Q9SXP2	formate dehydrogenase 1, mitochondrial (LOC4341069)	0.93396906	UP	0.348973
Q6ZGP5	uncharacterized LOC4330755 (LOC4330755)	0.93297648	UP	0.101932
Q7Y1I5	60S ribosomal protein L4 (LOC9272589)	0.90329684	UP	0.007234
A0A0P0V204		0.82945699	UP	0.51531
A0A0N7KFD4		0.82151322	UP	0.090781
Q7XBV4	uncharacterized LOC4349493 (LOC4349493)	0.81123866	UP	0.045644
Q8W3J0	UDP-glucuronic acid decarboxylase 6 (LOC4332424)	0.78691084	UP	0.035389
Q6Z130	putative deoxyribonuclease TATDN1 (LOC4342437)	0.76630867	UP	0.574149
A0A0N7KDK7		0.74107205	UP	0.129236
P0C358	PSI P700 apoprotein A2 (psaB)	0.73924898	UP	0.214116

B9G3V1		0. 71711335	UP	0. 009627
Q657T1		0. 71453773	UP	0. 200952
Q10D00	ATP-dependent RNA helicase SUV3, mitochondrial (LOC4334089)	0. 70916122	UP	0. 025149
Q5JMS7		0. 70060656	UP	0. 008172
Q5VRH6		0. 70025224	UP	0. 116588
P12123	cytochrome b6 (petB)	0. 68032454	UP	0. 101595
A0A0P0V5M8		0. 67993145	UP	0. 344259
Q10Q21	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta (LOC4332040)	0. 6730795	UP	0. 418404
Q5SNJ4	mitochondrial-processing peptidase subunit alpha (LOC4327300)	0. 67137995	UP	0. 04439
Q8H8U5	protein IN2-1 homolog B (LOC4332455)	0. 66706898	UP	0. 011168
Q6K8E9	uncharacterized LOC4331074 (LOC4331074)	0. 66529789	UP	0. 127409
P37832	tubulin beta-7 chain (LOC4334309)	0. 66452804	UP	0. 555219
P0C355	PSI P700 apoprotein A1(psaA)	0. 66292631	UP	0. 223893
Q0E3B5		0. 64648733	UP	0. 291412
P0C437	photosystem II protein D2 (psbD)	0. 64219217	UP	0. 160585
Q84P96	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (LOC4331150)	0. 64011412	UP	0. 035664
Q53KJ5	cyanidin 3-O-rutinoside 5-O- glucosyltransferase-like (LOC107276133)	0. 6332201	UP	0. 422285
P0C364	photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein (psbB)	0. 61054248	UP	0. 194471
Q656A8	U-box domain-containing protein 20-like (LOC107275483)	0. 61003777	UP	0. 392559
Q6ESR4	dehydrin COR410 (LOC4330265)	0. 60954202	UP	0. 57402
A0A0P0V0K3		0. 60485811	UP	0. 107393
Q6F3B0	dnaJ protein homolog (LOC4334359)	0. 60330311	UP	0. 026739
A0A0N7KD33		0. 60309014	UP	0. 16665
Q0JBY3	F-box/LRR-repeat protein 14 (LOC4336323)	0. 60004371	UP	0. 019192
A0A0P0Y632		-0. 60572618	Down	0. 733353
K22E_HUMAN		-0. 66406262	Down	0. 074566
Q6YY75	serine/threonine-protein kinase Nek6 (LOC4329828)	-0. 67184609	Down	0. 096679
K1C15_SHEEP		-0. 67495926	Down	0. 062334
Q6H8H3	50S ribosomal protein L19-2, chloroplastic (LOC9272428)	-0. 68601751	Down	0. 067715
Q7X720	phenylalanine ammonia-lyase-like (LOC9271676)	-0. 69320632	Down	0. 066186
K1C9_HUMAN		-0. 70340086	Down	0. 078473
THIO_HUMAN		-0. 71305079	Down	0. 470824
Q2QLY4	5- methyltetrahydropteroyltriglutamate- -homocysteine methyltransferase 2 (LOC4352833)	-0. 72330686	Down	0. 026772
Q6Z2G6	U-box domain-containing protein 6 (LOC4330463)	-0. 73262657	Down	0. 051326
Q8L4F4		-0. 73453397	Down	0. 140279
Q10MW6	dnaJ protein ERDJ3A (LOC4332515)	-0. 73709008	Down	0. 006861
Q6ZJ12	protein DETOXIFICATION 33 (LOC4346253)	-0. 73820231	Down	0. 550165
Q0IZB0		-0. 74375474	Down	0. 086076
A0A0P0XPM4		-0. 75466981	Down	0. 129663
A0A0P0VX24		-0. 75879019	Down	0. 012841
A0A0P0X9M8		-0. 77898511	Down	0. 0785
Q0DZE0	phenylalanine ammonia-lyase (LOC4330040)	-0. 78260276	Down	0. 226597
K1C10_HUMAN		-0. 79057181	Down	0. 038624
A0A0P0X037		-0. 7946453	Down	0. 137646
Q5N7X2	uncharacterized LOC4324318 (LOC4324318)	-0. 80077688	Down	0. 233249
Q0DRV6	superoxide dismutase [Cu- Zn]1(LOC4332846)	-0. 80210883	Down	0. 174157

K2C1_HUMAN		-0.80522585	Down	0.030337
Q0DQ06		-0.81315282	Down	0.065902
Q2QNA7		-0.81604922	Down	0.023485
A0A0P0UZ97		-0.82115209	Down	0.086786
Q6YSB4	cytochrome P450 76M5-like (LOC4345786)	-0.85604888	Down	0.421648
Q6AUN4	uncharacterized LOC4339652 (LOC4339652)	-0.87960238	Down	0.164878
Q0DZE5		-0.9043947	Down	0.028822
Q7XXS4	thiamine thiazole synthase 2, chloroplastic (LOC4343443)	-0.91049115	Down	0.003092
Q7XIR8	pre-mRNA-splicing factor ATP- dependent RNA helicase DEAH7 (LOC4343339)	-0.95716468	Down	0.007487
Q2RAX1	glutamate-rich WD repeat- containing protein 1(LOC4349700)	-1.00252794	Down	0.241571
Q6ZHP6	outer envelope membrane protein 7 (LOC4330521)	-1.0085118	Down	0.055836
A0A0P0VBA3	uncharacterized LOC9268172(LOC9268172)	-1.04439725	Down	0.082296
A0A0P0Y7P3		-1.05074633	Down	0.003216
Q10KN9	KH domain-containing protein At4g18375 (LOC4332959)	-1.0901434	Down	0.086173
A0A0P0VZ75		-1.12378101	Down	0.029858
A0A0P0VAM2		-1.16423303	Down	0.019722
Q6L4X7	low-temperature-induced cysteine proteinase (LOC4339265)	-1.32318914	Down	0.006549
A0A0P0W0Y8		-1.34170491	Down	0.227694
Q8L4L9		-1.59366477	Down	0.409948
Q6K680	probable steroid-binding protein 3 (LOC4330990)	-2.01754428	Down	0.009251
A0A0P0W473		-2.28737848	Down	0.030688
A0A0P0XPK5		-2.4119046	Down	0.239145
Q7XTH0	7-deoxyloganetin glucosyltransferase (LOC4335470)	-2.57766375	Down	0.396753



شکل ۱- نمودار ون مربوط به پروتئین‌های دارای بیان افتراقی. تصویر راست مربوط به بیوتیپ مقاوم و تصویر چپ مربوط به بیوتیپ حساس به علف‌کش یولاف وحشی زمستانه است.

Figure 1. Venn diagram showing the number of differentially expressed proteins (DEPs). Right: resistant biotype, and left: susceptible biotype of winter wild oats.

متابولیسمی و فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم مانند فتوسنتز می‌شوند (Sharma *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2019). ترکیبات پروتئینی اصلی در واکنش‌های نوری فتوسنتز شامل photosystem I, photosystem II, *b6f* و ATP سینتاز می‌باشند (Ganeteg *et al.*, 2004; Joaquin-Ramos *et al.*, 2014). در این بررسی، برخی از پروتئین‌های مرتبط با اجزای فوق در بیوتیپ مقاوم و بیوتیپ حساس تنظیم متفاوتی داشتند، به طوری که در بیوتیپ مقاوم، پروتئین‌های *psaA*, *petA*، زیرواحد بزرگ رابیسکو (*rbcL*)، کلروفیل *a-b* و سیتوکروم *b6*

متابولیسمی و فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم مانند فتوسنتز می‌شوند (Sharma *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2019). ترکیبات پروتئینی اصلی در واکنش‌های نوری فتوسنتز شامل photosystem I, photosystem II, *b6f* و ATP سینتاز می‌باشند (Ganeteg *et al.*, 2004; Joaquin-Ramos *et al.*, 2014). در این بررسی، برخی از پروتئین‌های مرتبط با اجزای فوق در بیوتیپ مقاوم و بیوتیپ حساس تنظیم متفاوتی داشتند، به طوری که در بیوتیپ مقاوم، پروتئین‌های *psaA*, *petA*، زیرواحد بزرگ رابیسکو (*rbcL*)، کلروفیل *a-b* و سیتوکروم *b6*

علف‌کش‌هایی همانند بنتازون افزایش یافت (Agostinetti *et al.*, 2019).

بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله علف‌کش‌ها منجر به تنش اکسیداسیونی می‌شوند و آسیب ناشی از آن تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) از جمله سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و انواع رادیکال هیدروکسیل می‌باشد. گیاهان سیستم‌های دفاعی مختلفی برای مقابله با تنش و آسیب‌های ناشی از آن را برای حفظ ساختارهای سلولی دارند. سوپراکسیداز دیسموتاز و پراکسیداز، اولین خط دفاعی گیاهان از طریق سم‌زدایی ریشه‌های سوپراکسید می‌باشند (Berwal & Ram, 2018). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و گلوتامین ردوکتاز، انواع اکسیژن فعال را کاتالیز می‌نمایند و باعث حذف و تبدیل آن‌ها به اکسیژن مولکولی می‌شوند (Dimaano & Iwakami, 2020; Dimaano *et al.*, 2020).

آمین اکسیداز (AOs)

در مطالعه حاضر، علاوه بر بیان افزایشی سوپراکسید دیسموتاز در بیوتیپ مقاوم، دو پروتئین دیگر شامل پروتئین پلی‌آمین اکسیداز (Q7XR46) و پروتئین (Q6ZJI2) نیز که نقش مهمی در سم‌زدایی گیاه دارند، بیان افزایشی داشتند (جدول ۱). آمین اکسیداز، دآمیناسیون اکسیداتیو ترکیبات اصلی پلی‌آمین (PAs) را کاتالیز می‌کند و در تولید آلدئیدها، آمونیا و H_2O_2 نقش دارد. پلی‌آمین‌ها ترکیبات بازی آلیفاتیک با وزن مولکولی پایین با دو یا بیشتر گروه آمینو و فعالیت بیولوژیکی قوی هستند و نقش مهمی در رشد و نمو، فرایندهای فیزیولوژیکی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند (Angelini *et al.*, 2010; Tavladoraki *et al.*, 2016). نقش پلی‌آمین‌ها در مقابله با تنش‌ها، پیچیده و در مواردی دوگانه است؛ از طرفی

(petB) تنظیم کاهشی داشتند، درحالی‌که در بیوتیپ حساس، پروتئین‌های psbB, psbD, psaA, psbA و petB دارای تنظیم افزایشی بودند (جدول ۱، ۲). دلیل این موضوع را می‌توان به افزایش هزینه شایستگی اکولوژیک در شرایط تنش نسبت داد. در بررسی مشابهی که بر روی پاسخ بیوتیپ‌های حساس و مقاوم سوروف انجام شده نیز نتایج مشابهی در ارتباط با کاهش بیان پروتئین‌های فتوسنتزی به‌دست آمد و دلیل آن به هزینه شایستگی اکولوژیک^۱ در بیوتیپ مقاوم نسبت داده شده است (Yang *et al.*, 2017).

پروتئین‌های مسئول پاسخ دفاعی

در این بررسی، سوپراکسید دیسموتاز (Q0DRV6) در بیوتیپ مقاوم، تنظیم افزایشی داشت (جدول ۱). یکی از سازوکارهای مهم بیوتیپ‌های مقاوم علف‌های هرز از جمله یولاف، فعالیت آنزیم‌هایی همچون سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز است که شکل‌های فعال اکسیژن را خنثی می‌کنند. سوپراکسید دیسموتازها (SODs) متعلق به خانواده آنزیم‌های فلزی و اولین خط دفاعی در مقابل تنش‌های اکسیداتیو در موجودات زنده هستند و دیسموتاسیون سوپراکسید (O_2) به O_2 و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم، در اجزای زیر سلولی که اکسیژن فعال تولید می‌کنند یافت می‌شود و بر اساس برهمکنش آن با یون‌های فلزی، به سه ایزوزایم تقسیم می‌شود. جایگاه SOD Cu/Zn در سیتوسول، کلروپلاست، پراکسی زوم و میتوکندری، جایگاه FeSOD در کلروپلاست و جایگاه MnSOD در میتوکندری قرار دارد (Scandalios, 1993; Racchi *et al.*, 2001; Das & Roychoudhury, 2014). در بسیاری از گیاهان، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش افزایش می‌یابد؛ به‌عنوان مثال در برنج، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان همانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بعد از کاربرد

¹ - Ecological Fitness Cost

بازدارنده ACCase و ALS، ناشی از بیان افزایشی پروتئین سیتوکروم CYP81A بود (Iwakami *et al.*, 2019). خانواده بزرگ سیتوکروم P450 در سم زدایی علف‌کش‌ها در مرحله اول نقش دارند (Guo *et al.*, 2019; Dimaano & Iwakami, 2020; Pandian *et al.*, 2020) و با توجه به نقش پروتئین‌های سم زدایی در مقاومت چندگانه به علف‌کش‌ها، به نظر می‌رسد که بیان افزایشی این پروتئین‌ها، وجود سازوکار با مقاومت متابولیکی در بیوتیپ مقاوم را تقویت می‌کند.

کینازها

براساس نتایج مطالعه حاضر، پروتئین B7F9F7 مربوط به سرین/ترئونین کیناز در بیوتیپ مقاوم، تنظیم افزایشی و در بیوتیپ حساس، پروتئین Q6YY75 تنظیم کاهش‌ی داشت (جدول ۱، ۲). پروتئین سرین/ترئونین کیناز در ترمیم انواع آسیب وارد شده به DNA در چرخه سلولی از طریق تولید انواع اکسیژن فعال نقش دارد (Amable *et al.*, 2011). بررسی‌ها نشان می‌دهد که فاکتورهای نسخه برداری، پروتئین‌های مرتبط با مقاومت به بیماری‌ها و پروتئین کینازها، نقش مهمی در سیگنالینگ غشایی حاکم بر مقاومت به تنش‌ها، رشد و سازگاری با شرایط متنوع محیطی و تولید مثل دارد (Andersen *et al.*, 2018; Liang & Zhou, 2018).

سایر پروتئین‌ها

در این بررسی، پروتئین Q6K4S7 که با مقاومت به شوری در گیاهان مرتبط است، در بیوتیپ مقاوم دارای تنظیم افزایشی بود (جدول ۲). بررسی‌ها نشان می‌دهد که گیاهان در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی (تهاجم باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و گیاهان انگل) و تنش‌های غیر زیستی (سرما، گرما، شوری و علف‌کش‌ها)، شبکه‌ای از ژن‌های مرتبط با تنش با الگوی بیانی همپوشان که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم به‌وسیله فاکتورهای نسخه‌برداری تنظیم می‌شوند را به‌صورت

کاتابولیسم آن باعث تولید H_2O_2 و منبعی از اکسیدکننده‌های قوی می‌شود و تحت شرایط تنش، به سلول خسارت می‌زند. از طرف دیگر H_2O_2 ، مولکول پیام‌رسانی است که پاسخ دفاع آنتی‌اکسیدانی را فعال می‌کند و از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در تنظیم تنش‌های اکسیداتیو نقش دارد (Chen *et al.*, 2019)

سیتوکروم P450 (CYPs)

سازوکار متابولیکی گیاهان برای سمیت زدایی علف‌کش‌ها در سه مرحله انجام می‌شود. مرحله اول از طریق اضافه شدن یک گروه کارکردی به علف‌کش‌ها به‌وسیله اکسیداسیون و احیا یا هیدرولیز است که این مرحله، اغلب به‌وسیله سیتوکروم P450 مونواکسیژناز^۱ انجام می‌شود. در مرحله دوم، تغییرات پیچیده بیشتری همچون کنجوگاسیون^۲ با میانجی‌گری گلوکاتایون به‌وسیله گلوکاتایون-اس-ترانسفراز^۳ و یا گلوگز به‌وسیله گلوکوزیل-ترانسفراز^۴ انجام می‌شود. مرحله آخر سم زدایی علف‌کش‌ها، هدایت آن‌ها به واکوئل‌ها و یا ترکیب آن‌ها با دیواره سلولی می‌باشد (Dimaano & Iwakami, 2020; Dimaano *et al.*, 2020).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سیتوکروم P450 (Q6YSB4) در بیوتیپ مقاوم، تنظیم افزایشی داشت (جدول ۱). سیتوکروم P450 یکی از بزرگترین خانواده‌های آنزیمی در گیاهان است که در بردارنده آهن و تیولات به‌عنوان کوفاکتور می‌باشد. تاکنون ۳۰۰۰۰۰ ژن CYPs در موجودات مختلف شناسایی شده است و بررسی‌ها نشان می‌دهد CYPs نقش کلیدی در متابولیسم کردن ترکیبات درونی یا بیرونی با ساختار متفاوت از جمله علف‌کش‌ها دارد (Busi *et al.*, 2011; Dimaano *et al.*, 2020; Pandian *et al.*, 2020). برای مثال در سوروف، مقاومت تقاطعی به علف‌کش‌های

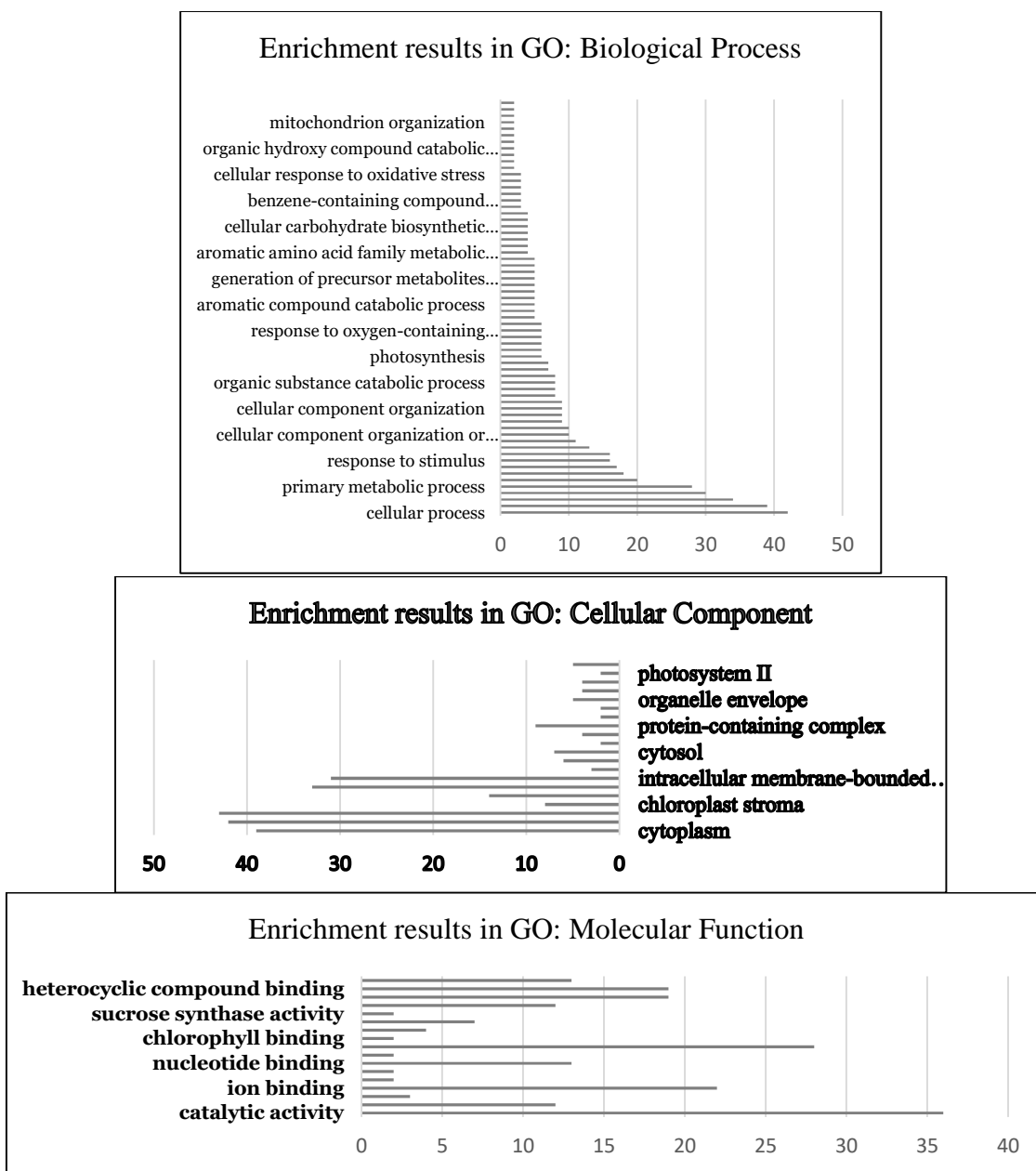
³ - Glutathione S-transferases (GSTs)

⁴ - Glucosyltransferases

¹ - Cytochrome P450 monooxygenase

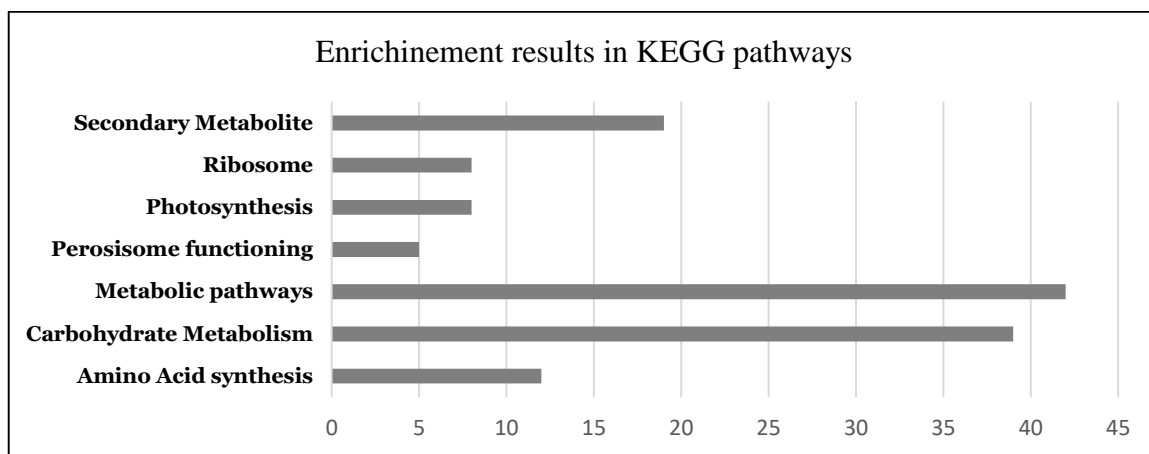
^۲ - Conjugation

یک باتری فعال می کنند (Eulgem & Somssich,) (2007; Golldack et al., 2011).



شکل ۲- دسته‌بندی پروتئین‌های افتراقی بیوتیپ‌های مقاوم و حساس به علف‌کش یولاف وحشی زمستانه با استفاده از آنالیز هستی‌شناسی (GO) در سه دسته کارکردهای مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و اجزای سلول.

Figure 2. Gene Ontology (GO) analysis of the annotated protein species (biological process, molecular function, cellular component).



شکل ۳- آنالیز مسیرهای متابولیکی KEGG پروتئین‌های با بیان افتراقی در بیوتیپ‌های مقاوم و حساس به علف‌کش یولاف وحشی زمستانه.

Figure 3. Analysis of KEGG metabolic pathways in DEPs herbicide resistant and susceptible biotypes of winter wild oats.

سیتوکروم P450 (Q6YSB4) که نقش مهمی در سم-زدایی علف‌کش‌ها دارد، در بیوتیپ مقاوم تنظیم افزایشی داشت. در فرآیند فتوسنتز، پروتئین‌های اصلی درگیر شامل *psaA*، *petA*، *psaA*، *psbD*، *psbB*، *psbD*، *petB* و *psbB* در بیوتیپ حساس دارای تنظیم افزایشی بودند. علاوه بر این، پروتئین‌های مرتبط با مقاومت به شوری مانند پروتئین Q6K4S7 و پروتئین کیناز B7F9F7 مربوط به سرین/ترئونین کیناز نیز در بیوتیپ مقاوم دارای تنظیم افزایشی بودند که به نظر می‌رسد این پروتئین‌ها می‌توانند در بروز مقاومت به علف‌کش‌ها نقش داشته باشند. به‌طور کلی و با توجه به نقش مهم پروتئین‌های سم‌زدایی و پروتئین سیتوکروم P450 و همچنین غنی‌تر بودن مسیرهای متابولیکی در دسته بندی KEGG به نظر می‌رسد که سازوکار مقاومت ایجاد شده در بیوتیپ مقاوم یولاف در این بررسی، مبتنی بر مقاومت متابولیکی باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج مربوط به مقایسه پروتئین‌های افتراقی در این بررسی نشان داد که در بیوتیپ مقاوم، ۱۳۸ پروتئین DEPs شناسایی شد که در آن ۶۸ پروتئین دارای تنظیم افزایشی و ۷۰ پروتئین دارای تنظیم کاهش بودند. همچنین در بیوتیپ حساس، ۹۳ پروتئین DEPs شناسایی شد که در آن ۴۷ پروتئین، تنظیم افزایشی و ۴۶ پروتئین، تنظیم کاهش نشان دادند. براساس نتایج آنالیز هستی‌شناسی (GO)، پروتئین‌های دارای بیان افتراقی تحت تیمارهای علف‌کش در بیوتیپ حساس و مقاوم، در سه دسته اصلی شامل کارکردهای مولکولی، فرایندهای بیولوژیکی و اجزای سلولی قرار گرفتند. آنالیز مسیرهای غنی‌سازی پروتئین‌های افتراقی با استفاده از KEGG نشان داد که غنی‌ترین مسیرها شامل مسیرهای متابولیک، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. در بیوتیپ مقاوم و در بین پروتئین‌های مسئول پاسخ دفاعی، سوپراکسید دیسموتاز (Q0DRV6)، پلی‌آمین اکسیداز (Q7XR46) و پروتئین (Q6ZJI2) بیان افزایشی داشتند. همچنین

منابع

- Agostinetto, D., Benemann, D.P., Cechin, J., Nohatto, M.A., Langaro, A.C., Piasecki, C. and Vargas, L. 2019. Gene Expression Related to Oxidative Stress Induced by Herbicides in Rice. *Agron. J.* 111: 1239-1245.
- Amable, L., Grankvist, N., Largen, J.W., Ortsäter, H., Sjöholm, A. and Honkanen, R.E. 2011. Disruption of serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5: PPP5c) in mice reveals a novel role for PP5 in the regulation of ultraviolet light-induced phosphorylation of serine/threonine protein kinase Chk1 (CHEK1). *J. Biol. Chem.* 286: 40413-40422.
- Andersen, E.J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., and Nepal, M.P. 2018. Disease resistance mechanisms in plants. *Genes.* 9: 339-343.
- Beckie, H.J. 2020. *Herbicide Resistance in Plants* (Multidisciplinary Digital Publishing Institute).
- Berwal, M.K., and Ram, C. 2018. Superoxide Dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants* (IntechOpen).
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Busi, R., Vila-Aiub, M.M., and Powles, S. 2011. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity.* 106: 817-824.
- Chen, C., Wang, C., Liu, Z., Cai, Z., Hua, Y., Mei, Y., Wei, L. and Liu, X. 2020. iTRAQ-based proteomic technique provides insights into salt stress responsive proteins in *Apocyni Veneti Folium* (*Apocynum venetum* L.). *Environ. Exp. Bot.* 180: 104247.
- Cheng, C., Liu, Y., Fang, W., Tao, J., Yang, Z. and Yin, Y. 2020. iTRAQ-based proteomic and physiological analyses of mustard sprouts in response to heat stress. *RSC Adv.* 10: 6052-6062.
- Chu, P., Yan, G.X., Yang, Q., Zhai, L.N., Zhang, C., Zhang, F.Q. and Guan, R.Z. 2015. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of *Brassica napus* leaves reveals pathways associated with chlorophyll deficiency. *J. Proteomics.* 113: 244-259.
- Das, K., and Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2: 53.
- Délye, C. 2013. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: A major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manage. Sci.* 69: 176-187.
- Dimaano, N.G., and Iwakami, S. 2020. Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants: Current understanding and prospects. *Pest Manag Sci.* 77: 22-32.
- Dimaano, N.G., Yamaguchi, T., Fukunishi, K., Tominaga, T., and Iwakami, S. 2020. Functional characterization of cytochrome P450 CYP81A subfamily to disclose the pattern of cross-resistance in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Mol. Biol.* 102: 403-416.
- Dong, M., Gu, J., Zhang, L., Chen, P., Liu, T., Deng, J., Lu, H., Han, L. and Zhao, B. 2014. Comparative proteomics analysis of superior and inferior spikelets in hybrid rice during grain filling and response of inferior spikelets to drought stress using isobaric tags for relative and absolute quantification. *J. Proteomics.* 109:382-399.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *CCurr. Opin. Plant Biol.* 10:366-371.
- Fan, S., Meng, Y., Song, M., Pang, C., Wei, H., Liu, J., Zhan, X., Lan, J., Feng, C. and Zhang, S. 2014. Quantitative phosphoproteomics analysis of nitric oxide-responsive phosphoproteins in cotton leaf. *PLoS One.* 9, e94261.
- Fang, J., Zhang, Y., Liu, T., Yan, B., Li, J. and Dong, L. 2019. Target-site and metabolic resistance mechanisms to penoxsulam in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.). *J. Agric. Food Chem.* 67: 8085-8095.
- Gaines, T.A., Duke, S.O., Morran, S., Rigon, C.A., Tranel, P.J., Küpper, A. and Dayan, F.E. 2020. Mechanisms of evolved herbicide resistance. *J. Biol. Chem.* REV120. 013572.
- Ganeteg, U., Klimmek, F. and Jansson, S. 2004. Lhca5—an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant Mol. Biol.* 54: 641-651.
- Gherekhloo, J., Oveisi, M., Zand, E. and De Prado, R. 2016. A review of herbicide resistance in Iran. *Weed Sci.* 64: 551-561.
- Golldack, D., Lüking, I., and Yang, O. 2011. Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* 30: 1383-1391.
- Guo, F., Iwakami, S., Yamaguchi, T., Uchino, A., Sunohara, Y. and Matsumoto, H. 2019. Role of CYP81A cytochrome P450s in clomazone metabolism in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Sci.* 283: 321-328.

- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. and Aebersold, R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17: 994-999.
- Hamdan, M. and Righetti, P.G. 2002. Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: Advantages and limitations. *Mass Spectrom. Rev.* 21: 287-302.
- Huffman, J., Hausman, N.E., Hager, A.G., Riechers, D.E. & Tranel, P. J. 2015. Genetics and inheritance of nontarget-site resistances to atrazine and mesotrione in a waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Illinois. *Weed Sci.* 63(4), 799-809.
- Heap, I. 2020. The international herbicide-resistant weed database. URL: [http://www. weedscience.org](http://www.weedscience.org) (accessed 01 April 2020).
- Iwakami, S., Kamidate, Y., Yamaguchi, T., Ishizaka, M., Endo, M., Suda, H., Nagai, K., Sunohara, Y., Toki, S. and Uchino, A. 2019. CYP 81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytol.* 221: 2112-2122.
- Jäck, O., Menegat, A. and Gerhards, R. 2017. Winter wheat yield loss in response to *Avena fatua* competition and effect of reduced herbicide dose rates on seed production of this species. *J. Plant Dis. Prot.* 124: 371-382.
- Joaquín-Ramos, A., Huerta-Ocampo, J.Á., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Baginsky, S. and de la Rosa, A.P.B. 2014. Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress. *J. Plant Physiol.* 171: 1423-1435.
- Jomi, A. 2020. Identification of resistant populations to ACCase and ALS inhibitor herbicides in (*Avena ludoviciana* Durieu.) of eight provinces in Iran and preparing their distribution map. Tarbiat Modares University (TMU). Tehran, Iran.
- Li, L.Q., Lyu, C.C., Li, J.H., Wan, C.Y., Liu, L., Xie, M.Q., Zuo, R.J., Ni, S., Liu, F. and Zeng, F.C. 2020. Quantitative proteomic analysis of alligator weed leaves reveals that cationic peroxidase 1 plays vital roles in the potassium deficiency stress response. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 2537.
- Liang, X. and Zhou, J.-M. 2018. Receptor-like cytoplasmic kinases: Central players in plant receptor kinase-mediated signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 267-299.
- Ma, C., Zhou, J., Chen, G., Bian, Y., Lv, D., Li, X., Wang, Z. and Yan, Y. 2014. iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. *BMC Genomics.* 15: 1029.
- Manadas, B., Mendes, V.M., English, J., and Dunn, M.J. 2010. Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert Rev Proteomics.* 7: 655-663.
- Maroli, A.S., Gaines, T.A., Foley, M.E., Duke, S.O., Doğramacı, M., Anderson, J.V., Horvath, D.P., Chao, W.S. and Tharayil, N. 2018. Omics in weed science: A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. *Weed Sci.* 66: 681-695.
- Marshall, R., Hanley, S.J., Hull, R. and Moss, S.R. 2013. The presence of two different target-site resistance mechanisms in individual plants of *Alopecurus myosuroides* Huds, identified using a quick molecular test for the characterisation of six ALS and seven ACCase SNPs. *Pest Manage.Sci.* 69: 727-737.
- Méchin, V., Damerval, C. and Zivy, M. 2007. Total protein extraction with TCA-acetone. In *Plant Proteomics* (Springer), pp. 1-8.
- Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends Plant Sci.* 22: 11-19.
- Nandula, V.K., Riechers, D.E., Ferhatoglu, Y., Barrett, M., Duke, S.O., Dayan, F.E., Goldberg-Cavalleri, A., Tétard-Jones, C., Wortley, D.J. and Onkokesung, N. 2019. Herbicide metabolism: Crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. *Weed Sci.* 67: 149-175.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Pan, L., Zhang, J., Wang, J., Yu, Q., Bai, L. and Dong, L. 2017. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in three fenoxaprop-P-ethyl-resistant *Beckmannia syzigachne* biotypes with differing ACCase mutations. *J. Proteomics.* 160: 47-54.
- Pandian, B.A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. and Jugulam, M. 2020. Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Autoxid.* 9: 454.
- Patton, W.F. 2002. Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatogr. B.* 771, 3-31.
- Patzoldt, W.L., Hager, A.G., McCormick, J.S. and Tranel, P.J. 2006. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proc Natl Acad Sci.* 103.33, 12329-12334.
- Piasecki, C., Yang, Y., Benemann, D.P., Kremer, F.S., Galli, V., Millwood, R.J., Cechin, J., Agostinetto, D., Maia, L.C. and Vargas, L. 2019. Transcriptomic analysis identifies new non-target site glyphosate-resistance genes in *Conyza bonariensis*. *Plants.* 8: 157.
- Powles, S.B. and Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.*

- 61: 317-347.
- Preston, C., Mallory-Smith, C.A., Powles, S. and Shaner, D. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. *Herbicide Resistance and World Grains* Boca Raton, FL: CRC, 23-60.
- Qin, J., Gu, F., Liu, D., Yin, C., Zhao, S., Chen, H., Zhang, J., Yang, C., Zhan, X. and Zhang, M. 2013. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ-based quantitative approaches. *Proteome Sci.* 11: 12.
- Salas-Perez, R.A., Saski, C.A., Noorai, R.E., Srivastava, S.K., Lawton-Rauh, A.L., Nichols, R.L. and Roma-Burgos, N. 2018. RNA-Seq transcriptome analysis of *Amaranthus palmeri* with differential tolerance to glufosinate herbicide. *PloS One.* 13:4, e0195488.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessaraki, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012.
- Shukla, A., Dupont, S. and Devine, M.D. 1997. Resistance to ACCase-inhibitor herbicides in wild oat: Evidence for target site-based resistance in two biotypes from Canada. *Pestic. Biochem. Physiol.* 57: 147-155.
- Su, X., Fan, X., Shao, R., Guo, J., Wang, Y., Yang, J., Yang, Q. and Guo, L. 2019. Physiological and iTRAQ-based proteomic analyses reveal that melatonin alleviates oxidative damage in maize leaves exposed to drought stress *Plant Physiol. Biochem.* 142: 263-274.
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smekens, J., and Wu, R. 2017. Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics. *Mol. Biosyst.* 13: 2574-2582.
- Tranel, P., Wright, T. and Heap, I. 2015. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. *Int Surv Herbic Resist weeds.* www.weedscience.Org.
- Varghese, N., Alyammahi, O., Nasreddine, S., Alhassani, A., and Gururani, M.A. 2019. Melatonin positively influences the photosynthetic machinery and antioxidant system of *Avena sativa* during salinity stress. *Plants.* 8, 610.
- Yang, X., Zhang, Z., Gu, T., Dong, M., Peng, Q., Bai, L. and Li, Y. 2017. Quantitative proteomics reveals ecological fitness cost of multi-herbicide resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.). *J. Proteomics.* 150: 160-169.
- Yu, F., Han, X., Geng, C., Zhao, Y., Zhang, Z. and Qiu, F. 2015. Comparative proteomic analysis revealing the complex network associated with water logging stress in maize (*Zea mays* L.) seedling root cells. *Proteomics.* 15: 135-147.
- Zand, E., Bena Kashani, F., Soufizadeh, S., Ebrahimi, M., Minbashi, M., Dastaran, F., Poorbayge, M., Jamali, M., Maknali, A. and Younesabadi, M. 2009. Study on the resistance of problematic grass weed species to clodinafop propargyl in wheat in Iran. *Environ. Sci.* 6: 145-160.
- Zand, E., Kashani, F.B., Baghestani, M.A., Maknali, A., Minbashi, M., Soufizadeh, S. and Deihimfard, R. 2007. Investigating the distribution of clodinafop-propargyl resistant wild oat (*Avena ludoviciana*) populations in South Western Iran. *Environ. Sci.* 4: 85-92.
- Zhang, M., Liu, C., Yang, J., Yang, P., Zhang, L. and Dong, J. 2017. Analysis of the herbicidal mechanism of 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid ethyl ester using iTRAQ and real-time PCR. *J. Proteomics.* 159: 47-53