

نقش جهش ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین در ایجاد مقاومت سطح بالا به علف‌کش

کلودینافوپ-پروپارژیل در توده‌های یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana*)

حمیدرضا ساسان‌فر^۱، مهدی راستگو^{۱*}، اسکندر زند^۲، عبدالرضا باقری^۳ و محمد حسن راشد محصل^۱

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد ۲- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱

چکیده

یولاف وحشی زمستانه یکی از علف‌های هرز مهم و مشکل‌ساز مزارع گندم ایران می‌باشد. علف‌کش‌های بازدارنده استیل‌کوآنزیم A (ACCase) به طور وسیعی برای کنترل یولاف وحشی در ایران استفاده می‌شوند. این روند باعث بروز مقاومت این علف‌هرز به این گروه از علف‌کش‌ها شده است. به منظور بررسی سطح مقاومت به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل (8% EC)، آزمایش دوز-پاسخ با ۱۰ مقدار (از ۰ تا ۳۲ برابر مقدار توصیه شده (۶۴ گرم ماده موثره در هکتار)) روی ۱۵ توده یولاف وحشی مقاوم و یک توده حساس جمع‌آوری شده از استان‌های فارس و خوزستان انجام شد. همچنین جهت ارزیابی مکانیسم مقاومت مبتنی بر محل هدف از روش CAPS و dCAPS استفاده شد. بر اساس نتایج آزمایش دوز-پاسخ سطح مقاومت به کلودینافوپ-پروپارژیل در سه توده M3، M2، M1، S4 از فارس و توده R5 از خوزستان بسیار بالا بود. به طوری که این توده‌ها حتی با کاربرد مقدار ۳۲ برابر مقدار توصیه شده نیز کنترل نشدند. شاخص مقاومت در این توده‌ها بر اساس بالاترین شاخص برآورد شده (در توده AN13) بیش از ۲۱/۹۳ بود. سه توده M1، S1 و F3 از فارس نیز مقاومت متوسطی (۱۰-۵) به علف‌کش نشان دادند. بر اساس نتایج آزمایش مولکولی، دو جهش ایزولویسین-۱۷۸۱-لویسین و ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین در توده‌های مقاوم شناسایی شد. ارزیابی نتایج آزمایش دوز-پاسخ و مولکولی نشان داد که در توده‌های M2 و R5 جهش ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین و در توده R5 به همراه شش توده از فارس شامل S1، S2، S3، S4 و ES1 و توده AN13 از خوزستان جهش ایزولویسین-۱۷۸۱-لویسین رخ داده است. این اولین گزارش وجود همزمان این دو جهش در یک توده یولاف وحشی در دنیا می‌باشد. نکته قابل توجه این بود که توده‌های M2 و R5 مقاومت بسیار بالایی به کلودینافوپ-پروپارژیل داشتند که با توجه به گزارش‌های موجود، جایگزینی ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین مرتبط با بروز مقاومت سطح بالا به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل و احتمالاً علف‌کش‌های دیگر از خانواده فوپ‌ها در یولاف وحشی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بازدارنده ACCase، روش‌های CAPS و dCAPS، شاخص مقاومت، مقاومت، مقاومت به علف‌کش

* Corresponding author. E-mail: m.rastgoo@um.ac.ir

مقدمه

Rastgoo, 2007; Benakashani, *et al.*, 2006; Gherekhloo, 2008; Sasanfar, *et al.*, 2009a,b

مکانیسم مبتنی بر محل هدف متداول‌ترین مکانیسم مقاومت در علف‌های هرز می‌باشد که باعث بروز مقاومت با درجه بالاتری به علف‌کش می‌شود (Hochberg *et al.*, 2009). نتایج بسیاری از مطالعات روشن کرده است که در بیشتر موارد ACCase غیرحساس به علف‌کش (به دلیل وقوع یک جهش) مسئول مقاومت به باریک‌برگ‌کش‌ها می‌باشد (Shukla *et al.*, 1997; Seefeldt, 1996; Gherekhloo, *et al.*, 2012). تاکنون ۱۲ جهش در هفت موقعیت (۱۷۸۱، ۱۹۹۹، ۲۰۲۷، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸، ۲۰۸۸ و ۲۰۹۶) در دامنه کربوکسیلاز ترانسفراز ژن پلاستییدی کدکننده آنزیم ACCae کشف شده است که با ایجاد تغییر در ساختمان آنزیم ACCase منجر به مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز باریک‌برگ می‌شوند (Liu *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2015). جهش‌های مختلف می‌توانند الگوهای مقاومت عرضی گوناگونی در میان علف‌کش‌های بازدارنده ACCase ایجاد کنند (Jang *et al.*, 2013). به طور کلی، جهش‌های تریپتوفان-۱۹۹۹-سرین/سیستئین (Trp-1999-Ser/Cys)، تریپتوفان-۲۰۲۷-سیستئین (Trp-2027-Cys)، ایزولوسیپین-۲۰۴۱-آسپاراژین/والین (Ile-2041-Asn/Val) و گلیاسین-۲۰۹۶-آلانین/سرین (Gly-2096-Ala/Ser) تنها سبب ایجاد مقاومت به یک یا چند علف‌کش از خانواده فوپ می‌شوند، در حالی که جانشینی‌ها در ایزولوسیپین-۱۷۸۱-لوئوسین/والین/تریپتوفان (Ile-1781-Leu/Val/Thr)، آسپاراتات-۲۰۷۸-گلیاسین (Asp-2078-Gly) و سیستئین-۲۰۸۸-آرژنین (Cys-2088-Arg) باعث بروز مقاومت به همه علف‌کش‌های بازدارنده ACCase شامل فوپ‌ها، دیم‌ها و دن می‌شود (Jang *et al.*, 2013; Powles & Yu, 2010).

در جهت شناسایی مکانیسم مقاومت مبتنی بر محل هدف استفاده از روش‌ها مولکولی نظیر CAPS و dCAPS در سال‌های اخیر رو به گسترش بوده است. این روش‌ها قادر به

یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu)، علف خونی (*Phalaris spp.*) و چچم یکساله (*Lolium rigidum* Gaudin.) از تیره گندمیان، از علف‌های هرز مشکل‌ساز غالب در غلات هستند و عدم کنترل مناسب آن‌ها سبب افت عملکرد قابل ملاحظه‌ای در گندم می‌شود (Baghestani *et al.*, 2009). یولاف وحشی به دلیل رقابت با گیاه زراعی، جوانه‌زنی متناوب و قابلیت دوام بذر آن در بانک بذر مزرعه، تهدیدی جدی برای عملکرد گیاه زراعی از نظر اقتصادی محسوب می‌شود (Owen & Powles, 2009).

علف‌کش‌هایی بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (ACCase) از زمان معرفی‌شان در سال ۱۹۷۸ به طور گسترده برای کنترل باریک‌برگ‌ها و به خصوص یولاف وحشی در دنیا استفاده شده‌اند (Adamczewski *et al.*, 2013; Powles & Yu, 2010). کارایی بالا بر علیه علف‌های هرز باریک‌برگ و امکان مصرف این گروه از علف‌کش‌ها به صورت پس‌رویشی در گیاهان زراعی مختلف از عوامل مهم تأثیرگذار در استفاده گسترده آن‌ها طی سال‌های گذشته محسوب می‌شود (Cruz-Hipolito *et al.*, 2015). اما، تکیه بیش از اندازه روی این گروه از علف‌کش‌ها منجر به تکامل مقاومت در علف‌های هرز شده است (Delye, 2005). تاکنون ۷۳ مورد یولاف وحشی مقاوم در دنیا ثبت شده است که بیشتر موارد مربوط به مقاومت به بازدارنده‌های ACCase می‌باشند (Heap, 2017). در ایران، اولین مورد مقاومت به علف‌کش‌ها در سال ۱۳۸۳ در یک توده یولاف وحشی جمع‌آوری شده از استان فارس به علف‌کش فنوکساپروپ-پی-اتیل گزارش شد (Zand *et al.*, 2004). پس از آن گزارش‌های متعدد از مقاومت علف‌های هرز باریک‌برگ شامل یولاف وحشی، علف خونی و چچم به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در مزارع گندم استان‌های فارس، اصفهان، گلستان، لرستان، ایلام و خوزستان ثبت شد (Elahifard, 2005; Elahifard, 2005).

با توجه وضعیت بروز مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در یولاف وحشی، آگاهی از الگوها و مکانیزم مقاومت در جهت مدیریت مقاومت به علف‌کش‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از آنجا که مکانیزم مبتنی بر محل هدف بدلیل وجود جهش‌های متفاوت، سبب الگوهای خاصی از بروز مقاومت در یولاف وحشی خواهند شد که مدیریت مخصوص به خود را می‌طلبد، از اینرو این آزمایش با هدف بررسی سطح مقاومت و مطالعه مولکولی مکانیزم مقاومت مبتنی بر محل هدف در توده‌های مختلف یولاف وحشی زمستانه جمع‌آوری شده از استان‌های فارس و خوزستان انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ در دو بخش شامل آزمایش دوز-پاسخ با گیاه کامل در گلخانه بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) و بررسی مبنای مولکولی مقاومت در آزمایشگاه بخش بیولوژی سیستم‌ها در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (کرج) انجام شد.

مواد گیاهی

مواد گیاهی این پژوهش شامل ۱۵ توده علف‌هرز یولاف وحشی زمستانه مقاوم و یک توده حساس به علف‌کش بود (جدول ۱)، که طی سال‌های گذشته با نظارت بخش تحقیقات علف‌های هرز و همکاری جمعی از پژوهشگران و براساس معیارهای تعیین شده جمع‌آوری بذر توده‌های مشکوک به مقاومت به علف‌کش (Beckie, et al., 2000)، از مزارع استان‌های فارس و خوزستان جمع‌آوری شده بودند. لازم به ذکر است که با انجام آزمایش‌های غربال اولیه، مقاومت به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل در توده‌های آزمایش تأیید شده بود. توده حساس از مناطقی جمع‌آوری شد که تاکنون سابقه‌ای از مصرف علف‌کش در آن مناطق وجود نداشت.

تشخیص بین بوته‌های هموزایگوس و هتروزایگوس می‌باشند و شامل سه مرحله PCR، هضم آنزیمی و الکتروفورز هستند. هر دو روش بسیار شبیه هم می‌باشند با این تفاوت که در روش dCAPS با ایجاد یک یا چند تغییر پایه‌ای در یکی از دو پرایمر مورد استفاده در روش CAPS، امکان تشخیص ناحیه هضم شده برای توالی DNA جهش یافته و وحشی میسر شده است (Barth et al., 2002; Kaundun & Windass, 2006). در یک آزمایش Rastgoo et al. (2006) مقاومت در یولاف وحشی را با استفاده روش dCAPS مطالعه کرد. نتایج این پژوهش، بروز مقاومت در ۱۹ توده یولاف وحشی را نشان داد، که از این توده‌ها ۱۰ توده جهش ۱۷۸۱ را داشتند. بر اساس گزارش‌ها مقاومت به واسطه جانشینی Ile-1781-Leu منجر به مقاومت عرضی به هر دو گروه علف‌کش‌های خانواده فوپ و دیم، به استثنای کلتودیم می‌شود (Yu et al. 2007). Liu et al. (2007) بیان کرد که جهش در Trp-2027-Cys منجر به مقاومت به علف‌کش‌های فوپ و تغییر در Asp-2078-Gly باعث مقاومت به علف‌کش‌های فوپ و دیم و همچنین کلتودیم می‌شود. در مطالعه دیگر با استفاده از روش dCAPS روی توده‌های فالاریس جمع‌آوری شده از استان فارس، هیچ یک از توده‌های مورد بررسی جهشی در موقعیت ۱۷۸۱ آنزیم ACCase نداشتند، اما سایر جهش‌ها در مکان ۲۰۲۷ یا ۲۰۲۸ یا هر دو تایید شد (Gherekhlou et al. 2012). کروز-هیپولیتو (۲۰۱۵) نیز با بررسی مبنای مولکولی مقاومت در یک بیوتیپ فالاریس جهش‌های نقطه‌ای Ile-1781-Leu و Asp-2078-Gly را شناسایی کرد (Cruz-Hipolito et al., 2015). این جانشینی‌ها که سبب مقاومت به همه علف‌کش‌های خانواده فوپ، دیم و دن می‌شود، پیش از این در Avena ludoviciana Durieu (Liu et al., 2007) و Lolium rigidum Gaudin (Powles & Yu, 2010) نیز گزارش شده است.

جدول ۱. تاریخچه مصرف باریک‌برگ‌کش‌ها طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۰ در مزارع گندم مورد نمونه‌برداری توده‌های یولاف وحشی زمستانه.

Table 1. A history of Graminicides usage during 2000-2006 at wheat farms where winter wild oat populations were collected.

Population	Location	Herbicide applied
W/F-M1/85	Marv Dasht	Clodinafop (6 years)
W/F-M2/85	Marv Dasht	Clodinafop (4 years), fenoxaprop (2 years)
W/F-M3/85	Marv Dasht	Clodinafop (4 years), fenoxaprop (2 years)
W/F-M4/85	Marv Dasht	Clodinafop (5 years), fenoxaprop (1 year)
W/F-F3/85	Fasa	Clodinafop (4 years), clodinafop + diclofop (1 year), fenoxaprop (1 year)
W/F-S1/85	Sepidan	Clodinafop (5 years)
W/F-S2/85	Sepidan	Clodinafop (3 years), fenoxaprop (2 years), fenoxaprop + difenzoquat (1 year)
W/F-S3/85	Sepidan	Clodinafop (2 years), diclofop (1 year)
W/F-S4/85	Sepidan	Clodinafop (3 years), fenoxaprop (2 years), fenoxaprop + difenzoquat (1 year)
W/F-ES1/85	Estahban	Clodinafop (2 years)
W/Kh-AN6/84	Andimeshk	Clodinafop (5 years), clodinafop + fenoxaprop (1 year), diclofop (1 year)
W/Kh-AN9/84	Andimeshk	Clodinafop (2 years), fenoxaprop (4 year), benzoylprop (1 year)
W/Kh-AN13/84	Andimeshk	Clodinafop (5 years), clodinafop + fenoxaprop (1 year)
W/Kh-R5/84	Ramhormoz	Clodinafop (6 years)
W/Kh-SHT1/84	Shushtar	Clodinafop (6 years)
W/F-S(s)/85*	Sepidan	-

* توده حساس پیش از این در معرض کاربرد هیچ علف‌کش قرار نگرفته بود.

* The susceptible population has never been treated with any herbicide.

علف‌کش در مرحله‌ی دو تا سه برگی یولاف وحشی بوسیله دستگاه سمپاش ثابت اتوماتیک و مجهز به نازل (1103) متحرک بادبزینی یکنواخت با حجم پاشش ۱۷۸ لیتر در هکتار در فشار ۲ بار انجام شد. ۱۶ توده یولاف وحشی در معرض ۱۰ مقدار از علف‌کش کلودینافوپ-پروپازریل (تاپیک، ۸٪ EC) شامل ۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ برابر مقدار توصیه شده (۶۴ گرم ماده موثره در هکتار) قرار گرفتند.

در هفته‌ی چهارم پس از سمپاشی و بعد از شمارش تعداد بوته‌های زنده هر توده، نمونه‌های هر گلدان به صورت جداگانه از سطح خاک برداشت و پس از قرار گرفتن در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شدند. بر اساس وزن خشک اندام هوایی بوته‌های داخل هر گلدان، وزن خشک اندام هوایی تک‌بوته برای هر توده بدست آمد و درصد وزن خشک تک‌بوته تیمار شده با علف‌کش نسبت به شاهد خودش (تیمار نشده با علف‌کش از همان توده) محاسبه شد.

برای بدست آوردن شاخص مقاومت و منحنی‌های واکنش به دوز در توده‌های مقاوم و حساس، داده‌های مربوط به وزن خشک با معادله چهار پارامتره (معادله ۱) (Streibig *et al.*, 1993) و لوگ-جستیک برازش داده شدند (Seefeldt *et al.*, 1995).

جهت رفع خواب بذر، پیش از اجرای آزمایش ابتدا بذرهای توده‌های یولاف وحشی توسط دست پوست‌کنی و از سرمادهی مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته، استفاده شد (Beckie, *et al.*, 2000). پس از سپری شدن این زمان، بذرهای جهت کشت به گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر و حجم ۵۰۰ میلی لیتر حاوی رس، شن، کود دامی پوسیده و پرلیت به نسبت مساوی منتقل شدند. گلدان‌های کشت شده در گلخانه تحت شرایط کنترل شده با ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و با مشاهده روزانه رطوبت سطح خاک و در صورت نیاز آبیاری شدند.

آزمایش دوز-پاسخ

به منظور ارزیابی سطح مقاومت در توده‌های یولاف وحشی، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با شش تکرار در گلخانه انجام شد. بذر توده‌های مختلف یولاف وحشی پس از رفع خواب در داخل گلدان کشت شده و به گلخانه منتقل شدند. در ابتدا در هر گلدان ۱۰ تا ۱۲ عدد گیاهچه با در نظر گرفتن فاصله‌ی مناسب، و در عمق ۱/۵ سانتی‌متری از سطح خاک، کشت شدند. اما برای کاهش قدرت رقابتی، پیش از سمپاشی بوته‌های داخل هر گلدان به ۸ عدد تنک شدند. تیمار

جهت تعیین مکانیسم مقاومت در توده‌های مقاوم و حساس از روش CAPS و dCAPS استفاده شد. لازم به ذکر هست هر آزمایش دو مرتبه تکرار شد. این آزمایش شامل سه مرحله استخراج DNA، واکنش‌های PCR و در نهایت هضم آنزیمی توسط آنزیم برش دهنده بود (Kaundun & Windass, 2006).

استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه برگ تازه توده‌های یولاف وحشی کشت شده جهت آزمایش دوز-پاسخ در گلخانه استفاده شد. به این صورت که پس از گذشت سه هفته از کاربرد علف‌کش، برگ جوان بوته‌هایی که پس از کاربرد علف‌کش در مقدار توصیه شده یا بالاتر زنده باقی مانده بودند، جهت نمونه‌برداری انتخاب شدند. استخراج DNA از برگ گیاه با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا انجام شد (Dellaporta et al., 1983). جهت انجام آزمایش‌های بعدی، DNAهای استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین کمیت و کیفیت DNA

با سنجش نسبت جذب طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ توسط دستگاه نانودراپ، خلوص و کمیت DNAهای استخراج شده تعیین شد. برای اطمینان از کیفیت مناسب DNA و عدم شکستگی آن، مقداری از DNA روی ژل آگارز الکتروفورز شد. سپس DNA هر توده به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و برای واکنش PCR استفاده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

در این مطالعه از CAPS و dCAPS برای شناسایی جهش‌ها در چهار نقطه (۱۷۸، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ آنزیم ACCase استفاده شد. به این صورت که در روش dCAPS از جفت پرایمر NsiI1781f / NsiI1781r برای شناسایی جایگزینی اسید آمینه لوسین بجای ایزولوسین در نقطه (Ile-1781-Leu) ۱۷۸ و از جفت پرایمر ACCF1/EcoRV2078r برای شناسایی جایگزینی گلایسین بجای آسپاراژین در جایگاه ۲۰۷۸ (Asp-2078-Gly) استفاده شد. همچنین در روش CAPS از

$$Y = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(Z)))} \quad (1)$$

در این معادله Y = میزان پاسخ (درصد نسبت به شاهد) در دوز x ، α = غلظت علف‌کش (گرم ماده موثره در هکتار)، c = حد پایین منحنی، d = حد بالای منحنی، b = شیب خط و Z = میزان ED₅₀ یا دوزی از علف‌کش است که باعث کاهش ۵۰ درصدی وزن خشک بین حد بالا و پایین منحنی می‌شود. باید به این نکته توجه کرد که هنگامی که $c \neq 0$ است، نیازی به توصیف پارامتر Z نمی‌باشد، زیرا این دوز سبب کاهش مطلق ۵۰ درصدی در وزن خشک می‌شود که برابر با ED₅₀ واقعی است. به زبان دیگر کاهش وزن خشکی که در یک میزان کاربرد برابر با Z ایجاد می‌شود، مساوی $\frac{d+c}{2}$ است، نه $\frac{d}{2}$ (که برابر با کاهش ۵۰ درصدی واقعی وزن خشک است) همان‌طور که اشاره شد، پارامتر d میزان بیوماس تولیدی در شاهد تیمار نشده را نشان می‌دهد و نیاز است تا دوزی که این میزان را تا نصف کاهش می‌دهد برآورد شود. این دوز به عنوان "ED₅₀ مطلق" نامیده می‌شود و به صورت AED₅₀ مشخص می‌شود، که می‌توان آن را با استفاده از فرمول زیر از معادله ۲ محاسبه کرد (Sasanfar et al., 2017):

$$AED_{50} = \left(\frac{z^b d - c}{d - 2c} \right)^{1/b} \quad (2)$$

سطح مقاومت (شاخص مقاومت: R/S) توده‌های مختلف نسبت به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل، بر اساس نسبت AED₅₀ توده مقاوم به AED₅₀ توده حساس تعیین و میزان خطای استاندارد برای AED₅₀ و شاخص مقاومت (RI) با استفاده از روش دلتا برآورد شد (Billingsley, 1986). تجزیه رگرسیون با استفاده از دستور PROC NLMIXED توسط نرم افزار SAS Ver.9.4 صورت گرفت. همچنین برای رسم منحنی‌های دوز-پاسخ از نرم افزار SigmaPlot Ver.12.5 استفاده شد.

آزمایش مولکولی

اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TBE(1x) مورد الکتروفورز قرار گرفت و قطعات مورد نظر توسط دستگاه ژل داگ مجهز به اشعه UV مشاهده شد.

واکنش هضم آنزیمی

به منظور تشخیص توده‌های مقاوم و حساس از آنزیم‌های برشی NsiI، EcoRV، EcoRI و Eco47III به ترتیب برای بررسی جهش‌های Ile-1781-Leu، Asp-2078-Gly، Ile-2041-Asn و Cys-2088-Arg روی محصول PCR مربوطه استفاده شد (جدول ۳). واکنش‌های هضم آنزیمی در حجم نهایی ۳۲ میکرولیتر انجام شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، به میکروتیوب منتقل شد و سپس ۲ میکرولیتر آنزیم برشی مربوط به هر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر 10x و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام و پس از آن محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TBE(1x) مورد الکتروفورز قرار گرفت و نتایج توسط دستگاه ژل داگ مجهز به اشعه UV رویت شد.

جفت پرایمر ACCF1/ACCR1 برای شناسایی جایگزینی آسپارژین بجای ایزولوسین در جایگاه ۲۰۴۱ (Ile-2041-Asn) و جایگزینی آرژنین بجای سیستین در جایگاه ۲۰۸۸ (Cys-2088-Arg) استفاده شد (جدول ۲).

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Abi Veriti™ در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی یک میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۲) با غلظت ۵ میکرومولار، ۲ میکرولیتر از ۲۵ MgCl₂ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر از ۱۰ dNTP میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر از PCR buffer 10X، ۲ میکرولیتر از DNA ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر از Taq DNA polymerase ۵ واحد و بقیه تا حجم ۲۵ میکرولیتر نیز آب مقطر دیونیز بود. برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل خود از سه مرحله مجزا شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه تشکیل می‌شد. آخرین مرحله شامل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در روش CAPS و dCAPS.

Table 2. Primers used in CAPS and dCAPS methods.

Primer	Sequence 5'-3'	Method	Reference
ACCF1 ACCR1	CACAGACCATGATGCAGCTC CTCCCTGGAGTTGTGCTTT	CAPS for 2041 and 2088	Yu <i>et al.</i> , 2007
NsiI1781f NsiI1781r	CTGTCTGAAGAAGACTATGGCCG AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGCA	dCAPS for 1781	Kaundun and Windass, 2006
ACCF1 EcoRV2078r	CACAGACCATGATGCAGCTC GCACTCAATGCGATCTGGATTATCTTGATA	dCAPS for 2078	Yu <i>et al.</i> , 2007

جدول ۳. آنزیم‌های برشی مورد استفاده در روش CAPS, dCAPS.

Table 3. Restriction enzymes used in CAPS and dCAPS methods.

Enzyme	Commercial Isoschizomers	Restriction Site	Method	Reference
NsiI	AvallI, EcoT22I, MphI1031, Zsp2I	5'-ATGCA [^] T-3' 3'-T [^] ACGTA-5'	dCAPS (1781)	Kaundun and Windass 2006
EcoRV	Eco32I	5'-GAT [^] ATC-3' 3'-CTA [^] TAG-5'	dCAPS (2078)	Yu <i>et al.</i> , 2007
EcoRI	FunII	5'-G [^] AATTC-3' 3'-CTTAA [^] G-5'	CAPS (2041)	Yu <i>et al.</i> , 2007
Eco47III	AfeI, Aor51HI, FunI	5'-AGC [^] GCT-3' 3'-TCG [^] CGA-5'	CAPS (2088)	Yu <i>et al.</i> , 2007

نتایج و بحث

آزمایش دوز-پاسخ

مدل لوگ-لجستیک استفاده شده (معادله ۱) توانست به خوبی پاسخ وزن خشک یولاف وحشی را به افزایش دوزهای علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل توصیف کند. نتایج آزمایش نشان داد که سطح مقاومت به علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل در میان توده‌های مختلف یولاف وحشی متنوع بود. بر اساس نتایج توده حساس (S) بطورکامل در میزان پایین تر از توصیه شده (بین مقدار ۳۲ تا ۶۴ گرم ماده موثره در هکتار) کنترل شد. بطوری که در مقایسه با مقدار توصیه شده ۶۴ گرم ماده موثره در هکتار، وزن خشک توده حساس تنها با ۷/۱۸ گرم ماده موثره در هکتار علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل به میزان ۵۰ درصد کاهش یافت. مقایسه میزان‌های AED₅₀ برآورد شده توده‌های مقاوم نشان داد که این پارامتر به طور معنی‌داری بزرگتر از توده حساس بود (جدول ۴).

بر اساس نتایج شاخص مقاومت به علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل در توده‌های مختلف از ۱/۵۰ تا ۲۱/۹۳ > متغیر بود. سطح مقاومت در شش توده پایین تر از ۵ بود. بر این اساس توده‌های ES1 و S3 به ترتیب با ۱/۵۰ و ۱/۶۶ پایین‌ترین شاخص مقاومت را به خود اختصاص دادند. همچنین شاخص مقاومت در توده‌های AN6، M4، S2 و AN9 به ترتیب ۲/۵۸، ۳/۰۴، ۳/۱۰ و ۳/۵۴ بدست آمد. توده‌های M1، S1 و F3 سطح مقاومت متوسطی داشتند. به طوری که شاخص مقاومت در این توده‌ها به ترتیب برابر با ۵/۸۷، ۷/۲۴ و ۹/۲۱ بود. میزان علفکش مورد نیاز برای کاهش ۵۰ درصدی در این توده‌ها به ترتیب برابر با ۱۸/۵۵، ۲۱/۸۵، ۲۲/۲۲ و ۲۵/۴۴ گرم ماده موثره در هکتار بود. هر چند این دوزها پایین‌تر از دوز توصیه شده بودند اما باید به این نکته اشاره کرد که افزایش دوز تاثیری در کاهش بیشتر وزن خشک این توده‌ها نداشت. به طوری که این توده‌ها حتی در دوز ۳۲

برابر توصیه شده نیز توانستند حدود ۴۰ درصد از وزن خشک خود را نسبت به شاهد حفظ کنند. در میان توده‌ها بالاترین شاخص مقاومت برآورد شده مربوط به توده‌های AN13 و SHT1 بود. به طوری که نسبت مقاومت در این توده‌ها به ترتیب برابر با ۲۱/۹۳ و ۱۹/۴۵ برآورد شد. ۵۰ درصد کاهش در وزن خشک این توده‌ها نسبت به شاهد بدون علفکش به ترتیب در میزان ۱۵۷/۴۲ و ۱۳۹/۶۰ گرم ماده موثره از علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل حاصل شد. در میان توده‌های مورد آزمایش بر اساس وزن خشک، نسبت مقاومت در توده‌های M2، M3، R5 و S4 برآورد نشد و به نظر می‌رسد این توده‌ها مقاومت بسیار بالایی به علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل داشته باشند. به طوری که این توده‌ها حتی در بالاترین میزان استفاده علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل (۳۲ برابر میزان توصیه شده) معادل ۲۰۴۸ گرم ماده موثره در هکتار نیز توانستند بیش از ۵۰ درصد وزن خشک خود را نسبت به شاهد حفظ کنند (شکل ۱). در نتیجه شاخص مقاومت برای این توده‌ها قابل محاسبه نبود. به همین دلیل سطح مقاومت در این چهار توده بیشتر از بالاترین شاخص برآورد شده (۲۱/۹۳ >) در این بررسی برای توده AN13 بود (جدول ۴).

آزمایش مولکولی

روش CAPS

جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین (Ile-2041-Asn)

بررسی وقوع جانشینی آسپاراژین با ایزولوسین در نقطه ۲۰۴۱ آنزیم ACCase توده‌های یولاف وحشی با استفاده از جفت پرایمر ACCFI/ACCR1 انجام شد. این پرایمرها توانستند به خوبی قطعه ۴۹۲ جفت بازی مورد نظر را در همه توده‌های یولاف وحشی تکثیر کنند (شکل ۲ الف). جهت شناسایی گیاهان حساس و مقاوم از نظر وقوع این جهش، نیاز به هضم آنزیمی این قطعه با استفاده از آنزیم برشی بود. لذا در این مرحله محصولات PCR توده‌های مختلف یولاف وحشی با

جدول ۴. شاخص مقاومت و پارامترهای مدل لوگ-لجستیک استفاده شده برای محاسبه مقدار مورد نیاز برای ۵۰٪ کاهش در وزن خشک ۱۵ توده یولاف وحشی مقاوم (R) و یک توده حساس (S) به علف کش کلودینافوپ-پروپارژیل.

Table 4. Parameters of the log-logistic equation used to calculate the herbicide dose required for 50% reduction in the dry weight (AED₅₀) of 15 resistant (R) and one susceptible (S) biotypes of winter wild oat to clodinafop-propargyl.

Population	Upper limit (d)	Lower limit (c)	Slope (b)	AED ₅₀ ^a (g ai ha ⁻¹)	RI ^b
M1	0.17 (0.003) ^c	0.07 (0.002)	1.73 (0.190)	42.18 (5.622)	5.87 (0.872)
M2	0.22 (0.006)	0.14 (0.005)	0.97 (0.227)	> 2048 ^d	> 21.93
M3	0.17 (0.004)	0.09 (0.002)	3.55 (0.82)	> 2048	> 21.93
M4	0.21 (0.004)	0.08 (0.002)	3.23 (0.387)	21.85 (1.392)	3.04 (0.277)
S1	0.23 (0.004)	0.11 (0.002)	3.44 (0.635)	51.99 (8.989)	7.24 (1.338)
S2	0.26 (0.006)	0.11 (0.002)	2.62 (0.350)	22.22 (2.407)	3.10 (0.391)
S3	0.27 (0.007)	0.11 (0.003)	3.77 (1.570)	10.74 (1.340)	1.50 (0.211)
S4	0.25 (0.007)	0.13 (0.003)	3.21 (0.675)	> 2048	> 21.93
F3	0.21 (0.006)	0.09 (0.003)	1.88 (0.308)	66.13 (8.598)	9.21 (1.340)
ES1	0.15 (0.003)	0.03 (0.001)	2.42 (0.241)	11.89 (0.570)	1.66 (0.134)
AN6	0.18 (0.007)	0.05 (0.003)	2.02 (0.453)	18.55 (2.264)	2.58 (0.357)
AN9	0.17 (0.005)	0.06 (0.002)	2.22 (0.425)	25.44 (3.279)	3.54 (0.512)
AN13	0.21 (0.006)	0.08 (0.005)	0.89 (0.156)	157.42 (44.674)	21.93 (6.385)
R5	0.12 (0.006)	0.08 (0.003)	1.38 (0.601)	> 2048	> 21.93
SHT1	0.15 (0.005)	0.06 (0.004)	1.09 (0.198)	139.60 (31.065)	19.45 (4.509)
S ^e	0.50 (0.007)	0.05 (0.004)	1.04 (0.088)	7.18 (0.468)	-

AED₅₀ دوزی از علف کش است که باعث کاهش ۵۰ درصد واقعی وزن خشک می شود.

^b شاخص مقاومت، مقدارهای مشخص شده به صورت پر رنگ نشان دهنده معنی داری شاخص مقاومت می باشد (RI > 1).

^c مقدارهای داخل پرانتز میزان خطای استاندارد می باشند.

^d کاهش وزن خشک در دامنه دوزهای مصرف شده کلودینافوپ-پروپارژیل کمتر از ۵۰ درصد بود، از اینرو AED₅₀ برآورد نشد.

^e توده حساس

^a AED₅₀ is the dose of herbicide causing absolute 50% reduction in dry weight.

^b Resisance index, values shown in bold indicate herbicide resistant populations as determined by a significantly RI > 1.

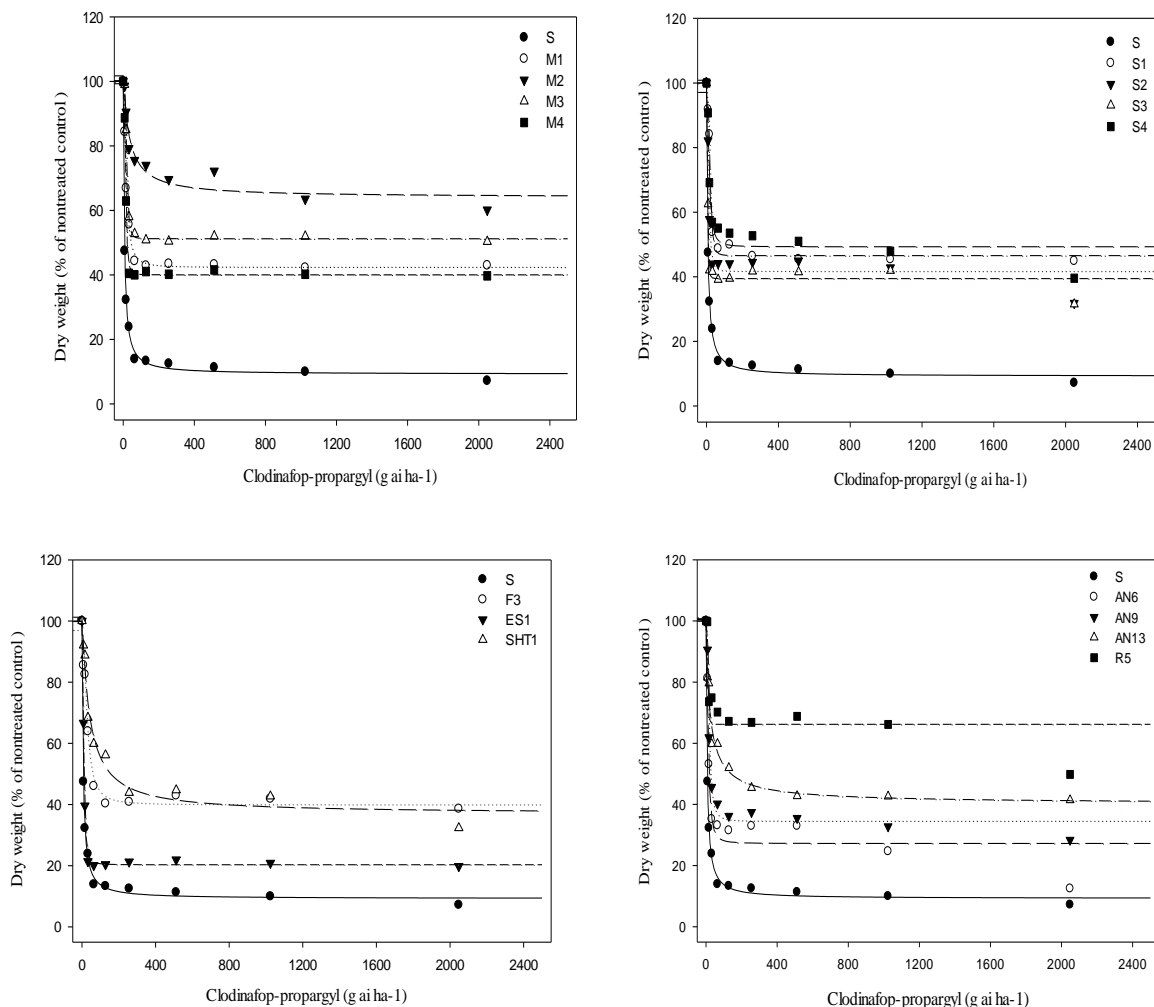
^c Values in parentheses indicate standard error.

^d Shoot dry weight reductions were less than 50% over the range of clodinafop-propargyl application rates, thus the AED₅₀ was not estimable.

^e Susceptible biotype

نتایج حاصل از برش آنزیمی قطعه تکثیر شده در مرحله PCR توده‌های مختلف یولاف وحشی نشان داد که در دو توده سه باند مشاهده می شود. به این صورت که بر اساس نتایج، توده‌های M2 از فارس و R5 از خوزستان هر دو با دادن یک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی همراه با دو باند هضم شده ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی حمل کننده جهش ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین می باشند. سایر توده‌های یولاف وحشی دارای دو باند هضم شده ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی بودند و از این نظر با توده حساس (S) تفاوتی نداشتند که نشان از عدم وقوع این جهش در این نقطه از آنزیم ACCase دارد (شکل ۲ ب).

استفاده از آنزیم برشی EcoR1، مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. در برش آنزیمی صورت گرفته بوسیله این آنزیم گیاهان هموزیگوت مقاوم حمل کننده دو آلل ۲۰۴۱-آسپاراژین، تک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی دارند. این در حالی است که گیاهان حساس هموزیگوت با دو آلل ۲۰۴۱-ایزولویسین، دارای دو باند هضم شده ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی می باشند. همچنین گیاهان هتروزیگوت مقاوم که حمل کننده هر دو آلل‌های ۲۰۴۱-آسپاراژین و ۲۰۴۱-ایزولویسین هستند، هر سه باند را نشان می دهند (Yu et al., 2007) (شکل ۲ ب).



شکل ۱. تاثیر کلودینافوپ-پروپارژیل بر وزن خشک ۱۵ توده یولاف وحشی مقاوم و حساس (S) جمع آوری شده از مزارع مرودشت (M1-M4)، فسا (F3)، سپیدان (S1-S4)، استهبان (ES1)، شوشتر (SHT1)، اندیمشک (AN6, AN9, AN13) و رامهرمز (R5) در آزمایش دوز-پاسخ.

هر نشانه میانگین شش تکرار را نشان می‌دهد.

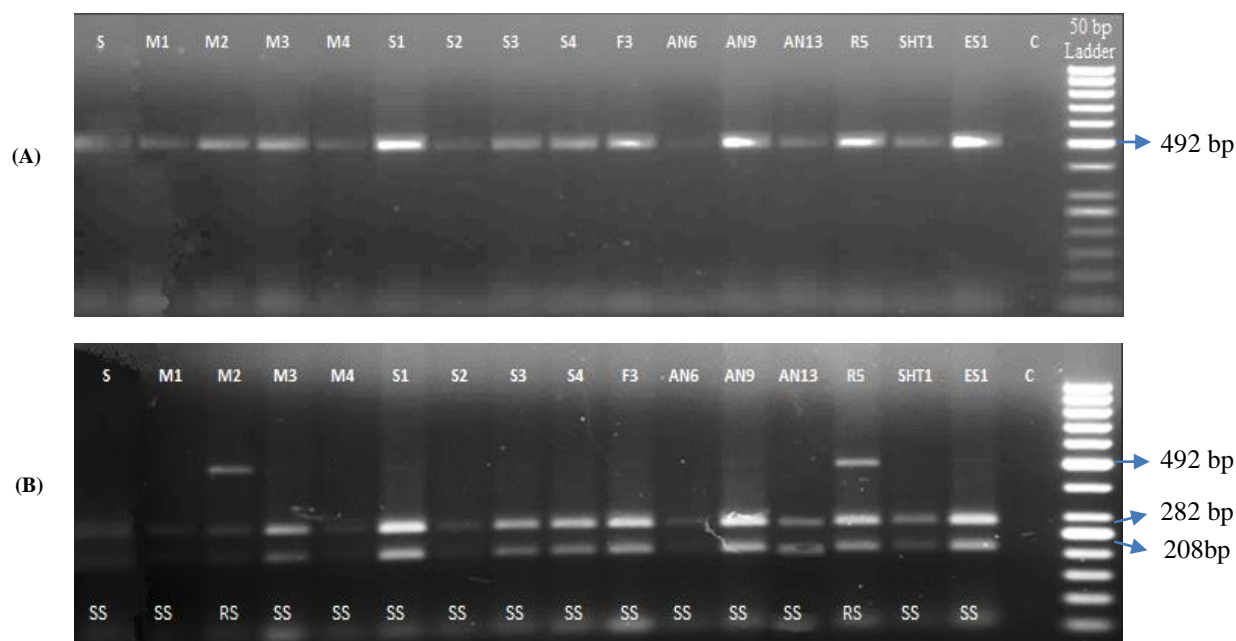
Figure 1. Effect of clodinafop-propargyl on dry weight of 15 resistant (R) and susceptible (S) biotypes of wild oat collected from the fields of Marvdasht (M1-M4), Fasa (F3), Sepidan (S1-S4) Estahban (ES1), Shushtar (SHT1), Andimeshk (AN6, AN9, AN13) and Ramhormoz (R5) in dose-response bioassay.

Each symbol represents the mean of six replicates.

توده‌های یولاف وحشی آزمایش به خوبی تکثیر شد (شکل ۳ الف). سپس محصول PCR حاصل از این قطعه در هر توده، توسط آنزیم برشی Eco47III مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

جهش سیستئین-۲۰۸۸-آرژنین (Cys-2088-Arg)

همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شد، جهت بررسی احتمال وقوع جهش سیستئین-۲۰۸۸-آرژنین از جفت پرایمر ACCF1/EcoRV2078r استفاده شد. محصول PCR این پرایمرها یک قطعه ۴۹۲ جفت بازی بود که در همه



شکل ۲. نتایج محصول PCR (الف) و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *EcoRI* (ب) برای شناسایی جهش ایزولویسین-۲۰۴۱-آسپاراژین در توده‌های یولاف وحشی.

SS بیوتیپ حساس هموزیگوت و RS بیوتیپ مقاوم هتروزیگوت را نشان می‌دهد.

Figure 2. Results of PCR product (A) and enzyme digestion with *EcoRI* (B) to identify Ile-2041-Asn mutation in wild oat biotypes.

SS shows the susceptible homozygote biotype and RS shows the resistance heterozygote biotype.

یولاف وحشی فاقد جهش سیستئین-۲۰۸۸-آرژنین باشند و از این نظر مشابه توده حساس هموزیگوت بودند.

روش dCAPS

جهش ایزولویسین-۱۷۸۱-لویسین (Ile-1781-Leu)

جهت بررسی وقوع جهش ایزولویسین-۱۷۸۱-لویسین در توده‌های یولاف وحشی مور آزمایش، نیاز به تکثیر قطعه ۱۶۵ جفت بازی توسط پرایمرهای NsiI1781f/NsiI1781r بود. نتایج این آزمایش نشان داد که پرایمرهای مربوطه توانستند قطعه مورد نظر را در همه توده‌های یولاف وحشی به خوبی تکثیر کنند (شکل ۴). پس از آن آنزیم برشی NsiI جهت هضم آنزیمی روی قطعه مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. این آنزیم برشی توانایی شناسایی گیاهان مقاوم هموزیگوت و هتروزیگوت و گیاهان حساس را دارد. به این صورت که در هضم آنزیمی توسط

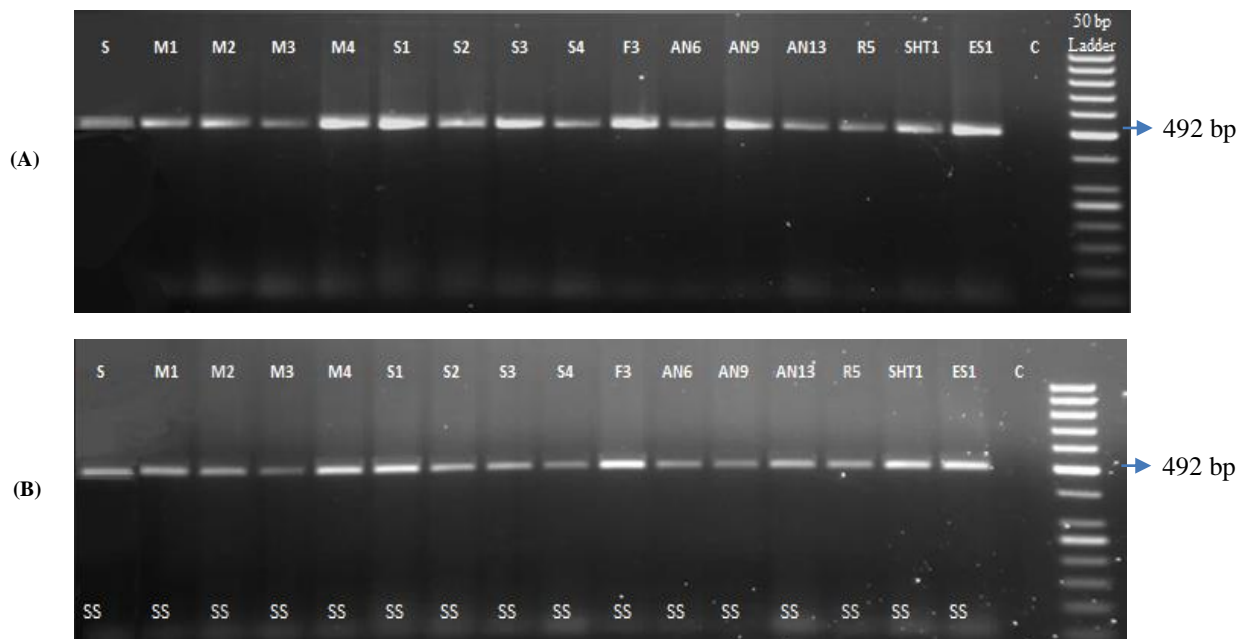
نتایج هضم آنزیمی در گیاهان هموزیگوت حساس حمل کننده دو آلل ۲۰۸۸-سیستئین، دارای یک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی مشاهده خواهد شد. در حالی که گیاهان هموزیگوت مقاوم محتوی دو آلل ۲۰۸۸-آرژنین دو باند هضم شده ۱۴۱ و ۳۵۱ جفت بازی را نشان می‌دهند. در حالی که گیاهان هتروزیگوت حمل کننده هر دو آلل ۲۰۸۸-سیستئین یافته و ۲۰۸۸-آرژنین، هر سه باند (هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی و هضم شده ۱۴۱ و ۳۵۱ جفت بازی) را نشان می‌دهند (Yu et al., 2007).

بر اساس نتایج حاصل از برش آنزیمی *Eco47III*، در هیچ یک از توده‌های یولاف وحشی مورد آزمایش باندهای هضم شده ۱۴۱ و ۳۵۱ جفت بازی مشاهده نشد و همه توده‌های یولاف وحشی یک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی را نشان دادند (شکل ۳ ب). از اینرو به نظر می‌رسد توده‌های مختلف

باند ۱۳۰ جفت بازی و ۱۶۵ جفت بازی می‌باشد (شکل ۴ ب)، که با توجه به الگوی برشی آنزیم NsiI، این توده‌ها مقاوم هتروزیگوت می‌باشند و احتمالاً در آن‌ها جهش ایزولوسین به لوسین در نقطه ۱۷۸۱ رخ داده است. البته نتایج مطالعه مولکولی روی سایر توده‌هایی که در آزمایش دوز-پاسخ مقاوم بودند نشان داد که جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین در این توده‌ها رخ نداده است. زیرا این توده‌ها (M1, M2, M3, M4, F3, AN6, AN9, AN13) همانند توده حساس (S) تنها یک باند هضم شده ۱۳۰ جفت بازی را نشان دادند که حاکی از عدم وقوع جهش مذکور در این نقطه می‌باشد (شکل ۴ ب). بنابراین این توده‌ها از نظر وقوع این جهش حساس هموزیگوت بودند.

این آنزیم برشی، گیاهان هموزیگوت حساس دارای آلل ۱۷۸۱-ایزولوسین، تک باند هضم شده ۱۳۰ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت مقاوم دارای آلل ۱۷۸۱-لوسین، تک باند هضم نشده ۱۶۵ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت دارای هر دو آلل ۱۷۸۱-ایزولوسین و ۱۷۸۱-لوسین، هر دو باند هضم نشده ۱۶۵ جفت بازی و تک باند ۱۳۰ هضم شده جفت بازی را نشان می‌دهند (Kaundun and Windass, 2006).

نتایج حاصل از مطالعه جانشینی لوسین به جای ایزولوسین در نقطه ۱۷۸۱ دامنه کربوکسیلارانسفراز آنزیم ACCase بر روی توده‌های مختلف یولاف وحشی نشان داد که وقوع این جهش در ۷ توده اتفاق افتاده است. بر اساس نتایج حاصل از هضم آنزیمی توده‌های مقاوم و حساس توده‌های S1, S2, S3, S4 و ES1 از فارس و توده‌های AN13 و R5 از خوزستان دارای دو

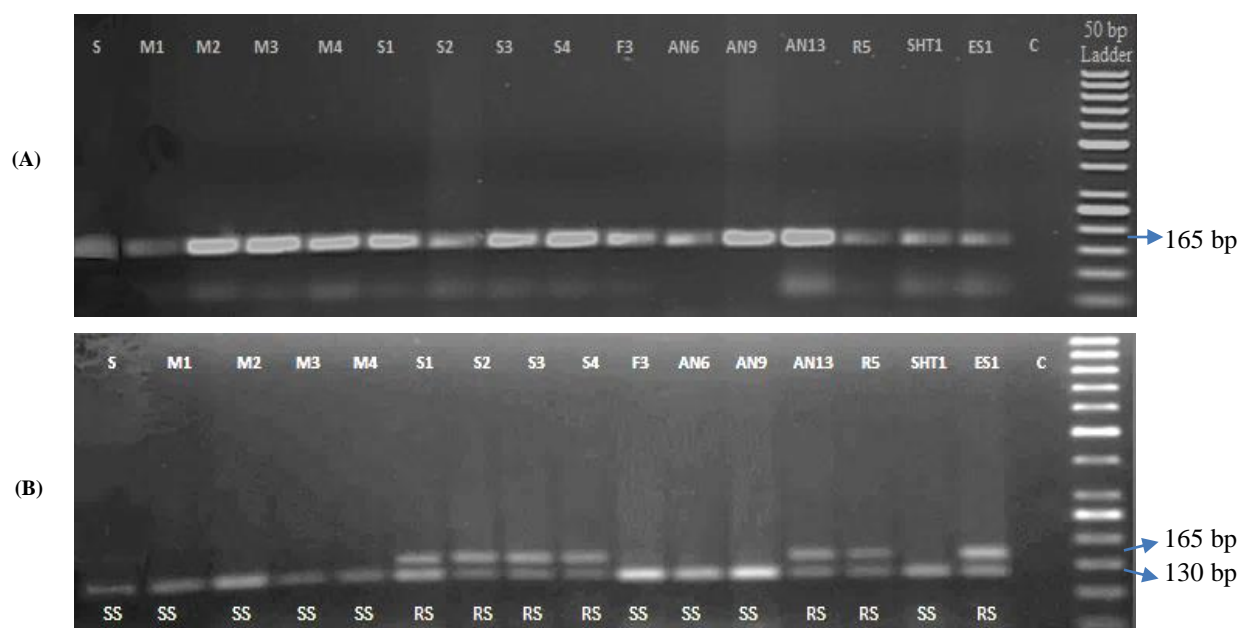


شکل ۳. نتایج محصول PCR (الف) و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی Eco47III (ب) برای شناسایی جهش سیستین-۲۰۸۸-آرژنین در توده‌های یولاف وحشی.

SS بیوتیپ حساس هموزیگوت را نشان می‌دهد.

Figure 3. Results of PCR product (A) and enzyme digestion with *EcoRI* (B) to identify Cys-2088-Arg mutation in wild oat biotypes.

SS shows the susceptible homozygote biotype.



شکل ۴. نتایج محصول PCR (الف) و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *NsiI* (ب) برای شناسایی جهش ایزولویسین-۱۷۸۱-لویسین در توده‌های یولاف وحشی.

SS بیوتیپ حساس هموزیگوت و RS بیوتیپ مقاوم هتروزیگوت را نشان می‌دهد.

Figure 4. Results of PCR product (A) and enzyme digestion with *EcoRI* (B) to identify Ile-1781-Leu mutation in wild oat biotypes.

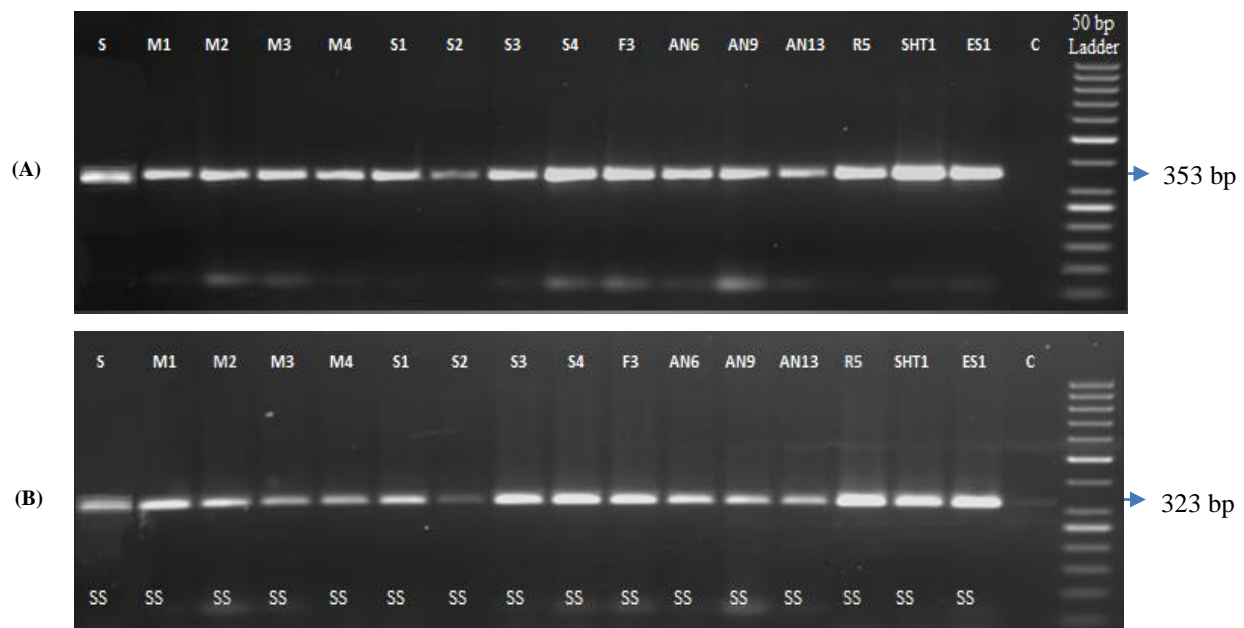
SS shows the susceptible homozygote biotype and RS shows the resistance heterozygote biotype.

هموزیگوت مقاوم حمل‌کننده آلل‌های گلیسین یک باند هضم نشده ۳۵۳ جفت بازی می‌دهند. اما گیاهان دارای هر دو آلل حساس اسپاراتات و مقاوم گلیسین هر دو باند ۳۲۳ و ۳۵۳ جفت بازی را دارند (Yu et al., 2007).

نتایج هضم آنزیمی روی توده‌های مختلف یولاف وحشی نشان داد که در همه توده‌های آزمایش یک باند هضم شده ۳۲۳ جفت بازی مشاهده شد و هیچ یک از توده‌ها باند هضم نشده ۳۵۳ جفت بازی را نداشتند (شکل ۵ ب). از اینرو به نظر می‌رسد در هیچ یک از توده‌های یولاف وحشی وقوع جهش اسپاراتات-۲۰۷۸-گلیسین رخ نداده است و همه توده‌ها از این نظر هموزیگوت حساس می‌باشند و تفاوتی با توده حساس از نظر وقوع جهش در این نقطه ندارند.

اسپاراتات-۲۰۷۸-گلیسین (Asp-1781-Gly)

جهت بررسی وقوع جهش در کدن ۲۰۸۸ آنزیم ACCase که منجر به جانشینی گلیسین به جای اسپاراتات می‌شود، ابتدا از جفت پرایمر ACCF1/ EcoRV2078r جهت تکثیر یک قطعه ۳۵۳ جفت بازی استفاده شد. نتایج نشان داد که این پرایمرها به خوبی توانستند این قطعه را در همه توده‌های یولاف وحشی مورد آزمایش تکثیر کند (شکل ۵ الف). سپس با استفاده از آنزیم برشی EcoRV روی محصول PCR هضم آنزیمی انجام شد تا امکان شناسایی توده‌های مقاوم و حساس فراهم شود. نتیجه هضم قطعه تکثیر شده توسط آنزیم برشی مربوطه در توده‌های حساس هموزیگوت دارای آلل‌های اسپاراتات، یک باند هضم شده ۳۲۳ جفت بازی می‌باشد. در مقایسه توده‌های



شکل ۵. نتایج محصول PCR (الف) و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *EcoRV* (ب) برای شناسایی جهش آسپاراتات-۲۰۷۸-گلایسین در توده‌های یولاف وحشی.

SS بیوتیپ حساس هموزیگوت را نشان می‌دهد.

Figure 5. Results of PCR product (A) and enzyme digestion with *EcoRI* (B) to identify Asp-2078-Gly mutation in wild oat biotypes.

SS shows the susceptible homozygote biotype.

بحث

پروپارژیل بسیار بالا بود به طوری که حتی با کاربرد ۱۰۲۴ گرم ماده موثره در هکتار از علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل، کاهش وزن خشک و زنده‌مانی در برخی از توده‌ها کمتر از ۵۰ درصد بود. (Uludag et al., 2007). نیز با بررسی مقاومت عرضی توده‌های یولاف وحشی (*Avena sterilis* L.) در ایالات متحده گزارش کردند که ۷ توده (از ۲۰ توده)، مقاومت عرضی به فنوکساپروپ-پی-اتیل و کلودینافوپ دارند. اما سطح مقاومت برای فنوکساپروپ-پی-اتیل بالاتر بود اولوداگ و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که شاخص مقاومت در ۵ توده یولاف وحشی به علفکش‌های خانواده فوپ (فنوکساپروپ-پی-اتیل، دیکلوفوپ-متیل-متیل و کوپیزالوپ-پی-تفوریل) ۲ تا ۴ برابر توده حساس بود (Uludag et al., 2008). سطح مقاومت بالا به علفکش‌های فوپ در توده‌های یولاف وحشی توسط محققین

به طور کلی با توجه به نتایج آزمایش گلخانه‌ای سطح مقاومت به علفکش کلودینافوپ-پروپارژیل در توده‌های یولاف وحشی مقاوم بطور معنی‌داری بالاتر از توده حساس بود. سطح مقاومت ایجاد شده در توده‌های مختلف در این آزمایش به همراه سایر گزارش‌های موجود به این نکته اشاره می‌کند که فشار انتخاب کاربرد علفکش‌های بازدارنده ACCase به ویژه فوپ‌ها در گندم منجر به تکامل و افزایش سطح مقاومت به این گروه از علفکش‌ها در توده‌های یولاف وحشی جمع آوری شده از استان‌های فارس و خوزستان شده است. به طوری که برخی توده‌ها حتی با کاربرد ۳۲ برابر مقدار توصیه شده علفکش نیز کنترل نشدند. (Sasanfar et al., 2009) نیز گزارش کردند که سطح مقاومت در دو توده یولاف وحشی به علفکش کلودینافوپ-

می‌کند (Jang *et al.*, 2013). به طور کلی گزارش شده است که جهش Ile-2041-Asn/Val به همراه جهش‌های Gly-2096-Ala/Ser و Trp-2027-Cys, Trp-1999-Ser/Cys تنها سبب ایجاد مقاومت به یک یا چند علف‌کش فوپ می‌شود. در حالی که جانشینی‌ها در Ile-1781-Leu/Val/Thr, Asp-2078-Gly, و Cys-2088-Arg باعث بروز مقاومت به همه علف‌کش‌های بازدارنده ACCase شامل فوپ‌ها، دیم‌ها و دن می‌شود (Jang *et al.*, 2013; Powles & Yu, 2010).

با توجه به این که شاخص مقاومت متفاوتی از ۱/۵ تا ۲۱/۹۳ در توده‌های مختلف یولاف وحشی دارای جهش Ile-1781-Leu مشاهده شد، باید به این نکته اشاره کرد که از آنجا که یولاف وحشی یک گونه هگزاپلوئید می‌باشد و سه جایگاه ژنی ناپیوسته دارد که به طور مستقل جور (تفکیک) شده‌اند، هر ژن همولوگ ACCase قادر به حمل جهش مربوط به خودش است. از اینرو هر جهش انفرادی مقاومت در این جایگاه‌های ژنی ACCase، می‌تواند سطح پایینی از مقاومت به علف‌کش را ایجاد کند، در حالی که وقوع همین جهش‌ها در گونه‌ها دیپلوئید هم خانواده سبب مقاومت بالاتر خواهد شد (Yu *et al.*, 2013). از اینرو احتمالاً در توده‌های دارای جهش Ile-1781-Leu با درجه مقاومت بالا، بروز این جهش در بیش از یک جایگاه ژنی در این نقطه رخ داده است که منجر به مقاومت سطح بالا به علف‌کش در برخی از توده‌ها شده است. همچنین بر اساس نتایج در توده R5 هر دو جهش Ile-2041-Asn و Ile-1781-Leu مشاهده شد که این اولین مورد کشف وجود همزمان هر دو جهش در یک توده یولاف وحشی در ایران و دنیا می‌باشد.

هر چند در توده‌های آزمایش در دو نقطه ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ جهشی مشاهده نشد اما وقوع این جهش‌ها در علف‌های‌هرز باریک برگ مانند *Alopecurus myosuroides* Huds. (Delye *et al.*, 2005)، *Lolium rigidum* Gaudin. و *Avena sterilis* L. (Liu *et al.*, 2007؛ Benakashani *et al.*, 2014)، گزارش شده است. همچنین با توجه به این که توده‌های M1، M3، M4،

دیگر نیز گزارش شده است (Mansooji *et al.* 1992؛ Seefeldt *et al.* 1994).

با مقایسه نتایج آزمایش دوز-پاسخ و مولکولی و گزارش‌های متعدد می‌توان به این نکته اشاره کرد که وقوع جهش Ile-1781-Leu از فراوانی بیشتری نسبت به سایر جهش‌ها در توده‌های مقاوم دارد (Delye *et al.*, 2005). Zand *et al.* (2010) نیز با مطالعه جهش‌های احتمالی در نقطه ۱۷۸۱ و ۲۰۴۱ به روش CAPS و dCAPS روی توده‌های یولاف وحشی به این نتیجه رسیدند که بیشتر توده‌های آزمایش دارای جهش در نقطه ۱۷۸۱ بودند. به طوری که از ۱۷ توده مورد مطالعه ۴۴ درصد جهش Ile-1781-Leu را داشتند. در حالی که جهش Ile-2041-Asn در هیچ کدام از توده‌ها مشاهده نشد. نتایج بررسی (Benakashani *et al.* 2014) بر روی توده‌های مختلف یولاف وحشی با استفاده از این روش نیز حاکی از وجود جهش در نقطه ۱۷۸۱ در ۵۷ درصد توده‌های آزمایش بود. Rastgoo *et al.* (2006). نیز با مطالعه روی ۱۹ توده یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase نشان دادند که از این توده‌ها ۱۰ توده دارای جهش Ile-1781-Leu بودند.

دو توده M2 و R5 که بر اساس آزمایش دوز-پاسخ مقاومت بسیار بالایی به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل نشان دادند، بر اساس نتایج مطالعه مولکولی دارای جهش Ile-2041-Asn هستند. لذا به نظر می‌رسد وقوع جهش یکسان در نقطه ۲۰۴۱ در هر دو توده، دلیل مقاومت بالا به علف‌کش کلودینافوپ-پروپارژیل باشد. با بررسی گزارش‌های دیگر نیز می‌توان به این نکته اشاره کرد که وقوع جهش Ile-2041-Asn در توده‌های یولاف وحشی منجر به مقاومت سطح بالا به علف‌کش‌های فوپ شده است. جهش‌های مختلفی در باریک برگ‌های مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2007, Yuan *et al.*, 2015) که بروز هر یک از این جهش‌ها در علف‌های‌هرز، الگوهای مقاومت عرضی خاصی را به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase ایجاد

استفاده از روش‌های مولکولی به منظور کشف سریع و تعیین مکانیزم مقاومت رو به افزایش می‌باشد. از آنجا که برخی از این روش‌ها مانند CAPS و dCAPS قادر به تشخیص گونه‌های هموزیگوت و هتروزیگوت نیز می‌باشند، لذا می‌تواند به شناخت هرچه بهتر در زمینه مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز باریک برگ کمک کند تا با تشخیص سریع و تعیین الگوی مقاومت نسبت به ارائه راهکارهای مدیریتی مناسب اقدام شود.

AN6، AN9 و SHT1 در آزمایش دوز-پاسخ به علف‌کش مقاومت نشان دادند اما بر اساس مطالعه مولکولی هیچ کدام از جهش‌های مورد بررسی در آن‌ها مشاهده نشد، می‌توان نتیجه گرفت که علت مقاومت در این توده‌ها می‌تواند وقوع جهش در سایر نقاط مانند ۱۹۹۹، ۲۰۲۷ و ۲۰۹۶ باشد و یا مکانیسم‌های مقاومت مبتنی بر غیر محل هدف در مقاومت این توده‌ها به علف‌کش دخیل است (Powles & Yu, 2010).

منابع

- Adamczewski, K., Kierzek, R. and Matysiak, K. 2013. Wild oat (*Avena fatua* L.) biotypes resistant to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase inhibitors in Poland. *Plant Soil & Envir.* 59: 432–437.
- Baghestani, M. A., Zand, E., Soufizadeh, S., Mirvakili, M. and Jafarzadeh, N. 2009. Antagonistic effect of 2, 4-D plus MCPA and clodinafop propargyl on wheat (*Triticum aestivum*) field weeds in Iran. *Appl. Entomol. Phytopathol. Pesticides Special Issue*: 1-18.
- Barth, S., Melchinger, A. E. and Lübberstedt, T. H. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecol.*, 11: 495–505.
- Beckie, H. J., Heap, I. M., Smeda, R. J. and Hall, L. M. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technol.* 14: 428–445.
- Benakashani, F., Zand, E. and Alizadeh, H. 2006. Resistance of wild oat (*Avena ludoviciana*) biotypes to clodinafop-propargyl herbicide. *Appl Entomol Phytopathol* 74:127–149
- Benakashani, F., Zand, E., Naghavi, M. R. and Sasanfar, H. 2014. Mutations in acetyl-CoA carboxylase enzyme, mechanism of cross resistance in wild oat (*Avena ludoviciana* Deuri.) biotypes to ACCase Inhibitor herbicides. *Iran J Weed Sci.* 10: 179–190. (In Persian with English summary).
- Billingsley, P. 1986. Probability and measure, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York, USA. 593 p.
- Cruz-Hipolito, H., Fernandez, P., Alcantara, R., Gharekhloo J., Osuna, M. D. and De Prado, R. 2015. Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly Mutations in ACCase Gene, Endow Cross-resistance to APP, CHD, and PPZ in *Phalaris minor* from Mexico. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 21363-21377.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Delye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: An update, *Weed Sci.* 53: 728–746.
- Delye, C., Zhang, X. Q., Michel, S., Matejcek, A. and Powles, S. B. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiol.* 137: 794-806.
- Elahifard, E. 2005. The Investigation of the resistance against aryloxyphenoxy propionate herbicides in littleseed Canarygrass (*Phalaris minor*). MSc thesis. Mashhad, Iran: Ferdwosi University of Mashhad. (In Persian with English summary).
- Gharekhloo, J. 2008. Tracing resistant *Phalaris minor* populations and studying their resistance mechanisms to aryloxyphenoxy propionate herbicides in Fars and Golestan wheat fields. Ph.D dissertation. Mashhad, Iran: Ferdwosi University of Mashhad. (In Persian with English summary).
- Gharekhloo, J., Osuna, M. D. and De Prado, R. 2012. Biochemical and molecular basis of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in Iranian *Phalaris minor* populations. *Weed Res.* 52: 367–372.
- Heap, I. 2017. International survey of herbicide resistant weeds. Web page: <http://www.weedscience.org>. Accessed: February 1, 2017.
- Hochberg, O., Sibony, M. and Rubin, B. 2009. The response of ACCase-resistant *Phalaris paradoxa*

- populations involves two different target site mutations. *Weed Res.* 49: 37–46.
- Jang, S., Marjanovic, J. and Gornicki, P. 2013. Resistance to herbicides caused by single amino acid mutations in acetyl-CoA carboxylase in resistant populations of grassy weeds, *New Phytol.* 197: 1110–1116.
- Kaundun, S. S. and Windass, J. D. 2006. Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* 46: 34–39.
- Liu, W. J., Harrison, D. K., Chalupska, D., Gornicki, P., O'Donnell, C. C., Adkins, S. W., Haselkorn, R. and Williams, R. R. 2007. Single-site mutations in the carboxyl transferase domain of plastid acetyl CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 3627–3632.
- Mansooji, A. M., Holtum, J.A.M., Boutsalis, P., Matthews, J. M. and Powles, S. B. 1992. Resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two wild oat species (*Avena fatua* and *Avena sterilis*). *Weed Sci.* 40: 599–605.
- Owen M. J and Powles S. B. 2009. Distribution and frequency of herbicide-resistant wild oat (*Avena* spp.) across the Western Australian grain belt. *Crop and Pasture Sci.* 60: 25–31.
- Powles, S. B. and Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides, *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 317–347.
- Rastgoo, M. 2007. Detecting of *Avena ludoviciana* resistant to aryloxyphenoxy propionate herbicides in wheat fields of Khuzestan province. Ph.D dissertation. Mashhad, Iran: Ferdwosi University of Mashhad. (In Persian with English summary).
- Rastgoo, M., Rashed Mohassel, M. H., Zand, E. and Nassiri Mahallati, M. 2006. Resistance of winter wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) to aryloxyphenoxy propionate herbicides in wheat fields of Khuzestan province: first screening test. *Iran J Weed Sci.* 2: 96–104.
- Sasanfar, H., Zand, E., Baghestani, M. A. and Mirhadi, M. J. 2009a. Resistance of wild oat (*Avena ludoviciana*) populations to clodinafop propargyl herbicide in Fars province. *Environ. Sci.* 7: 109–118. (In Persian with English summary).
- Sasanfar, H., Zand, E., Baghestani, M. A. and Mirhadi, M. J. 2009b. Resistance of winter wild oat (*Avena ludoviciana*) biotypes to pinoxaden in Fars province. *Iran J Weed Sci.* 5: 1–11. (In Persian with English summary).
- Sasanfar H., Zand, E., Baghestani, M. A., Mirhadi, M. J. and Mesgaran, B. M. 2017. Cross-resistance patterns of winter Wild Oat (*Avena ludoviciana*) populations to ACCase-inhibitor herbicides. *Phyto.* 45: 419–428.
- Seefeldt, S. S., Geally, D. R., Brewster, B. D. and Fuerst, E. P. 1994. Cross-resistance of several diclofop resistant wild oat (*Avena fatua*) biotypes from the Willamette Valley of Oregon. *Weed Sci.* 42: 324 430–437.
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E. and Fuerst, E. P. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose–response relationships. *Weed Technol.* 9: 218–227.
- Seefeldt, S. S., Fuerst, E. P., Gealy, D. R., Shukla, A., Irzyk, G. P. and Devine, M. D. 1996. Mechanisms of resistance to diclofop of two wild-oat (*Avena fatua*) biotypes from the Willamette Valley of Oregon. *Weed Sci.* 44: 776–781.
- 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.
- Streibig, J.C., Rudemo, M. and Jensen, J. E. 1993. Dose-response curves and statistical models. In: Streibig, J. C., Kudsk, P. (Eds.), *Herbicide Bioassays*. pp. 29–55. CRC Press, Boca Raton.
- Uludag, A., Nemli, Y. Tal, A. and Rubin, B. 2007. Fenoxaprop resistance in sterile wild oat (*Avena sterilis*) in wheat fields in Turkey. *Crop Protection.* 26: 930–935.
- Uludag, A., Park, K. W., Cannon, J. and Mallory-Smith, C. A. 2008. Cross resistance of acetyl-CoA carboxylase (ACCCase) inhibitor-resistant wild oat (*Avena fatua*) biotypes in the Pacific Northwest. *Weed Technol.* 22: 142–145.
- Yu, Q., Collavo, A., Zheng, M. Q., Owen, M., Sattin, M. and Powles, S. B. 2007. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiol.* 145: 547–558.
- Yu, Q., Ahmad-Hamdani, M. S., Han, H., Christoffers, M. J. and Powles, S. B. 2013. Herbicide resistance-endowing ACCCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species. *Heredity.* 110: 220–231
- Yuan, G., Weitang, L., Yaling, B., Long, D., Wenlei, G. and Jinxin W. 2015. Molecular basis for resistance to ACCCase-inhibiting herbicides in *Pseudosclerochloa kengiana* populations. *Pesti. Biochem. & Physiol.* 119: 9–15.

Zand, E., Bazoobandi, M., Maknali, A., Hatami, S. and Feridounpoor, M. 2004. Investigation of resistance to some herbicides of pyridazinone, phenyl-carbamate and thiocarbamates in weeds of sugar beet fields and efficacy of the local and original formulations. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID%4IR2012067024>. Accessed February 1, 2017.

Zand, E., Razmi, A., Banakashani, F., Nazari, F. and Gharakhloo, J. 2010. Using the dCAPS method to detect the resistance of wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) to clodinafop-propargyl in comparison with current methods. *Iran J Weed Sci.* 6: 33-52. (In Persian with English summary).

Role of Ile-2041-Asp in Conferring High-Level Resistance to Clodinafop-Propargyl in Winter Wild Oat (*Avena Ludoviciana*) Populations

Hamidreza Sasanfar^{1,2}, Mahdi Rastgoo¹, Eskandar Zand², Abdolreza Bagheri³ and Mohammad Hassan Rashed Mohassel¹

1- Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Campus, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran 2- Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran 3- Biotechnology Department, Agriculture Campus, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Winter wild oat is an important and troublesome weed in wheat fields. Herbicides that inhibit the enzyme acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase inhibitors) have been widely used to control grass weeds such as wild oat in Iran, which has resulted in evolution of resistance to these herbicides in wild oat. Whole-plant dose-response assay with 10 doses (from 0 to 32 times of the recommended rate, 64 g ai ha⁻¹) was conducted to determine resistance level (RI) to clodinafop-propargyl (EC 8%) in 15 resistant and one susceptible wild oat populations from Fars and Khuzestan in southwest Iran. To evaluate the mechanism of resistance in resistant populations, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) markers were used. The results of dose-response experiment clearly revealed that four (M2, M3, S4 from Fars and R5 from Khuzestan) out of fifteen populations were highly resistant to clodinafop-propargyl, where these populations were not even controlled over the range of 32 times of clodinafop-propargyl recommended rate. Therefore, resistance level in above population was greater than 21/93, the highest estimated RI for AN13. Three populations (M1, S1 and F3 from Fars) showed moderate resistance to clodinafop-propargyl with RI, 5-10. Based on molecular approaches, two known mutations (Ile-1781-Leu and Ile-2041-Asp) were identified in resistant populations. Results of a robust molecular assay demonstrated that the Ile-2041-Asp substitution occurred in M2 and R5 populations and the Ile-1781-Leu substitution occurred in the R5 population and 6 other populations; S1, S2, S3, S4, ES1 from Fars and AN13 from Khuzestan. This is the first report of a winter wild oat population carrying the both mutations in the world. Interestingly, this study revealed that Ile-2041-Asp substitution is associated with conferral of high-level resistance to clodinafop-propargyl and possibly other herbicides from FOPs family in winter wild oat.

Key words: Accase inhibitors, CAPS and dCAPS methods, herbicide resistance, resistance index