

جهش در آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز، مکانیسم مقاومت عرضی بیوتیپ‌های یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Deuri.) به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase

فاطمه بناکاشانی^{۱*}، اسکندر زند^۲، محمدرضا نقوی^۳ و حمیدرضا ساسان فر^۴

۱- پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات علف‌های هرز ۳- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه بیوتکنولوژی ۴- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۵

چکیده

به منظور تشخیص مکانیزم احتمالی مقاومت براساس محل عمل و نوع جهش‌های صورت گرفته در آنزیم ACCase، ۱۳ بیوتیپ یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Deuri.) جمع‌آوری شده از استان خوزستان که دارای مقاومت عرضی به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase بودند آزمایشات مولکولی انجام شد. در این آزمایشات جهش‌های مهم در محل کربوکسیل ترانسفراز آنزیم ACCase (شامل چهار جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین، سیستین-۲۰۸۸-آرژنین، ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلايسين) مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام این مطالعه از روش‌های CAPS و dCAPS استفاده شد. هردو روش شامل سه مرحله استخراج DNA از بیوتیپ‌های مورد آزمایش، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و در نهایت هضم توسط آنزیم برشی اختصاصی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که ۵۳/۸ درصد بیوتیپ‌های مقاوم به بازدارنده‌های ACCase دارای جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و ۷/۶ درصد بیوتیپ‌ها دارای جهش آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلايسين می‌باشند. در بین بیوتیپ‌های مورد بررسی تنها یک بیوتیپ دارای دو جهش (ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلايسين) بود و در هیچکدام از بیوتیپ‌های مورد مطالعه جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین و سیستین-۲۰۸۸-آرژنین دیده نشد. بنابراین الگوهای مختلف مقاومت عرضی بیوتیپ‌های یولاف وحشی به دلیل وجود جهش‌های مختلف در ناحیه کربوکسیل ترانسفراز آنزیم ACCase می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جهش، مقاومت مبتنی بر محل هدف، آنزیم ACCase، CAPS، dCAPS

* Corresponding author. E-mail: benakashani@cc.iut.ac.ir

مقدمه

شش اسید آمینه مختلف نقش حساسیت به بازدارنده‌های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز را بر عهده دارند (Yu *et al.*, 2007). در حال حاضر، ۸ جانشینی آمینو اسیدی باعث تکامل مقاومت به ACCase ها در علف‌های هرز مزارع شده است که عبارتند از: جایگزینی لوسین با ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ (Ile1781Leu)، جایگزینی ایزولوسین با آسپارژین در موقعیت ۲۰۴۱ (Ile2041Asn)، جایگزینی اسید آسپارژیک با گلیسین در موقعیت ۲۰۷۸ (Asp2078Gly)، جایگزینی سیستئین با آرژینین در موقعیت ۲۰۸۸ (Cys2088Arg)، جایگزینی تریپتوفان با سیستئین در موقعیت ۱۹۹۹ (Trp1999Cys)، جایگزینی تریپتوفان با سیستئین در موقعیت ۲۰۲۷ (Trp2027Cys)، جایگزینی ایزولوسین با والین در موقعیت ۲۰۴۱ (Ile2041Val) و جایگزینی گلیسین با آلانین در موقعیت ۲۰۹۶ (Gly2096Ala) (Vila-Aiub *et al.*, 2009). بررسی‌ها نشان می‌دهد که جهش در ناحیه ۱۷۸۱ از اهمیت و عمومیت بی‌شتری در بی‌ن‌گونه‌ها برخوردار است (De'lye *et al.*, 2005; De'lye *et al.*, 2003).

در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی به این دلیل که پی‌جویی مقاومت را ساده کرده‌اند رو به پیشرفت می‌باشند. تکنیک CAPS یا PCR - RFLP، قادر به شناسایی تفاوت‌های تک نوکلئوتید (SNP) هایی است که در محل شناسایی آنزیم‌های برشی رخ داده‌اند و باعث حذف یک مکان برشی یا ایجاد مکان برشی جدیدی می‌شوند. در این ارزیابی از مارکرهای هم‌بارز استفاده می‌شود که قادر به تشخیص گیاهان هموزیگوس و هتروزیگوس می‌باشند (Barth *et al.*, 2002). اما این روش قادر به تشخیص جهش‌هایی که خارج از سایت برشی اتفاق می‌افتند، نمی‌باشد. یک روش کامل‌تر از CAPS روش dCAPS است که رهیافتی ساده، اقتصادی و قابل تعمیم برای گونه‌های مختلف بوده و به سادگی قادر به تشخیص گونه‌های مقاوم هموزیگوس و هتروزیگوس می‌باشد (Neff *et al.*, 1998). روش dCAPS بسیار شبیه CAPS می‌باشد با این تفاوت که با یک یا چند تغییر پایه‌ای در یکی از دو پرایمر مورد

رایج‌ترین روش برای کنترل علف‌های هرز باریک برگ، استفاده از بازدارنده‌های آنزیم استیل کوآنزیم آ (ACCase) می‌باشد (Beckie & Kirkland, 2003; Hassan *et al.*, 2002). اطلاعات مولکولی و بیوشیمیایی نشان داده است که قسمت کربوکسیل ترانسفراز در آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز همومریک اصلی‌ترین محل هدف برای علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز می‌باشد (De'lye, 2005; Christoffers, 1999). در نتیجه این نوع علف‌کش‌ها فرایند تولید اسیدهای چرب را مختل کرده و از این طریق باعث ایجاد اختلال در غشای سلولی می‌شوند، همچنین شیب پروتونی را نیز دچار اختلال می‌کنند (Kuk *et al.*, 2000). استفاده مداوم از این نوع علف‌کش‌ها منجر به ایجاد مقاومت و تکامل علف‌های هرز مقاوم به این علف‌کش‌ها شده است (Powles *et al.*, 1997).

مکانیسم وابسته به محل هدف به‌عنوان یک دسته از مکانیسم مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز به حساب می‌آید که به سه صورت جهش در آنزیم همومریک پلاستیدی (De'lye *et al.*, 2005)، افزایش فعالیت آنزیم همومریک پلاستید (Bradley *et al.*, 2001) و تحمل ذاتی آنزیم همومریک پلاستید (De'lye, 2005) می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده مشخص گردیده که جهش‌های مختلف آنزیم همومریک دارای اهمیت خاصی در تکامل مقاومت عرضی به علف‌کش‌ها در گیاهان می‌باشند. از طرفی علف‌های هرز باریک برگ مقاوم به بازدارنده‌های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز از نظر مقاومت عرضی دارای الگوهای متنوعی می‌باشند (Bourgeois *et al.*, 1997). تنوع سطوح و الگوهای مقاومت عرضی در بین بیوتیپ‌ها نشان‌دهنده وجود بیش از یک سازوکار مقاومت یا وجود جهش‌های متفاوت در بیوتیپ‌های یولاف وحشی می‌باشد (Uludag *et al.*, 2008; Seefeldt *et al.*, 1994).

علفکش‌های بازدارنده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز تایید شده بود (Benakashani *et al.*, 2010). لذا این تحقیق به منظور تعیین مکانیزم احتمالی مقاومت بر مبنای محل عمل و همچنین نوع جهش‌های عامل بروز مقاومت صورت گرفت. در انجام این مطالعه از روش‌های CAPS و dCAPS استفاده شد. هردو روش شامل سه مرحله استخراج DNA از بیوتیپ‌های مورد آزمایش، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و در نهایت هضم توسط آنزیم برشی اختصاصی بود.

استخراج DNA از برگ گیاه با روش CTAB انجام شد (Cullings, 1992; Doyle & Doyle, 1987). ارزیابی کمی DNAهای استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و ارزیابی کیفی با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد. سپس DNAها به غلظت ۵۰-۶۰ نانوگرم در می‌کرولیتر رقیق شده و برای واکنش PCR استفاده شدند. در هردو روش غلظت مواد بکار رفته در واکنش PCR و هضم آنزیمی مشابه هم بود. واکنش‌های PCR در هر دو روش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (جدول ۱). برنامه دمایی و زمانی دستگاه PCR در بررسی جهش‌های احتمالی در هر دو روش به صورت مشابه تعریف شده بود. برنامه 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 جدی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه تشکیل شده بود. آخرین مرحله شامل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. در بررسی جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین و سیستمین-۲۰۸۸-آرژنین، گسترش رشته جدی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به جای یک دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت.

نیاز برای PCR در روش CAPS امکان تشخیص ناحیه هضم شده برای توالی DNA جهش یافته و وحشی میسر شده است (Barth *et al.*, 2002). زند و همکاران (Zand *et al.*, 2013)، نیز از روش‌های مولکولی ذکر شده جهت بررسی کارایی روش‌های مولکولی برای تشخیص مقاومت علف‌هرز یولاف وحشی نسبت به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل در مقایسه با سه روش رایج شامل غربال گیاه کامل در گلدان، غربال گیاهچه در پتری و واکنش به دز گیاه کامل در گلدان استفاده کردند.

در بررسی انجام شده روی ۱۳ بیوتیپ مقاوم جمع آوری شده از استان خوزستان مشخص شد که این بیوتیپ‌ها دارای مقاومت عرضی به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase می‌باشند. همچنین الگوهای مقاومت عرضی مشاهده شده در این گیاهان متنوع بود (Benakashani *et al.*, 2010). از اینرو به منظور تشخیص مکانیزم احتمالی مقاومت براساس محل عمل و نوع جهش‌های صورت گرفته در آنزیم ACCase، آزمایش‌های مولکولی روی بیوتیپ‌های ذکر شده انجام شد و جهش‌های مهم در ناحیه کربوکسیل ترانسفراز آنزیم ACCase (شامل چهار جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین، سی‌ستین-۲۰۸۸-آرژنین، ای‌زولوسین-۱۷۸۱-لوسین و آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلای‌سین) مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌ها روی ۱۳ بیوتیپ مقاوم SH1/86, A1/85, AN6/85, D2/86, SH3/86, AN4/85, SH1/85, AN7/85, AN8/84, AN14/84, SH3/85, D/85) یک بیوتیپ حساس (S) جمع آوری شده از استان خوزستان صورت گرفت. نامگذاری بیوتیپ‌ها براساس سیستم کدبندی بانک بذور مقاوم موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی است که به ترتیب نشان دهنده شهرستان محل جمع آوری، شماره و سال جمع آوری بیوتیپ می‌باشد. در بررسی‌های مختلف انجام گرفته، مقاومت عرضی بیوتیپ‌های مقاوم و همچنین حساسیت بیوتیپ حساس به

جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین: جفت پرایمر ACCF1/ACCR1 (جدول ۳) برای تکثیر قطعه ۴۹۲ جفت بازی استفاده شد و به دنبال آن برش توسط آنزیم *EcoRI* (جدول ۴) صورت گرفت (Yu et al., 2007).

جهش سیستین-۲۰۸۸-آرژنین: جفت پرایمر ACCF1/ACCR1 برای تکثیر قطعه ۴۹۲ جفت بازی استفاده شد، سپس توسط آنزیم *Eco47 III* (جدول ۴) برش داده شد.

جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین: از پرایمرهای NsiII1781f /NsiII1781781r (جدول ۵) جهت تکثیر قطعه ۱۶۵ جفت بازی استفاده شد. سپس توسط آنزیم *Nsi* (جدول ۶) هضم آنزیمی صورت گرفت (Kaundun & Windass, 2006).

اسید اسپارتیک-۲۰۷۸-گلايسين: جفت پرایمر ACCF1/ EcoRV2078r (جدول ۵)، قطعه ۳۵۳ جفت بازی را تکثیر می‌کند. در طراحی پرایمر *EcoRV2078r*، نوکلئوتیدهای مطابقت ناپذیر آدنین:گوانین (A:G) وارد شده است که باعث ایجاد یک جایگاه برشی برای آنزیم *EcoRV* (جدول ۶) می‌شود (Yu et al., 2007).

جدول ۳. نام و توالی پرایمرهای بکار برده شده در روش CAPS

Table 3. Primers and their sequences were used in CAPS method

Primer	Sequence 3'-5'	Reference
ACCF1	CACAGACCATGATGCAGCTC	Yu et al, 2007
ACCR1	CTCCCTGGAGTTGTGCTTTC	

جدول ۴. آنزیم‌های برشی استفاده شده در روش CAPS

Table 4. Restriction enzymes were used in CAPS method

Enzyme	Isoschizomers	Site of restriction
<i>EcoRI</i>	-	5'-G ^A AATTC-3'
		3'-CTTAA ^G -5'
<i>Eco47 III</i>	<i>AfeI, AitI, Aor51H, FunI</i>	5'-AGC ^G GCT-3'
		3'-TCG ^C CGA-5'

جدول ۱. مواد و غلظت‌های بکار رفته در واکنش PCR

Table 1. Material and their concentrations in PCR reaction

Material	Volume in one reaction	Final concentration
DNA (50 ng/μl)	2 μl	100 ng/ μl
PCR buffer 10X	2.5 μl	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1 μl	2mM
dNTPmix (20 mM)	0.25 μl	0.2mM
Primer F (100 Pmol/μl)	0.1 μl	10PM
Primer R (100 Pmol/μl)	0.1 μl	10PM
Tag polymerase (5 U/μl)	0.25 μl	0.05unit/ μ l
H ₂ O ₂	18.8 μl	18.8 μ l

واکنش هضم آنزیمی در حجم نهایی ۳۲ میکرولیتر، به مدت ۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. حجم مواد مورد نیاز برای یک واکنش آنزیمی در هردو آزمایش، در جدول ۲ آورده شده است. قابل ذکر است کلیه مواد مورد استفاده در واکنش PCR، هضم آنزیمی و لدر مورد استفاده در الکتروفورز ساخت شرکت فرمنتاس بود. پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شد.

در این تحقیق وجود یا عدم وجود جهش‌های ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و اسید اسپارتیک-۲۰۷۸-گلايسين بوسیله روش dCAPS و جهش‌های ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین، سیستین-۲۰۸۸-آرژنین بوسیله روش CAPS ارزیابی شد.

جدول ۲. حجم مواد مورد نیاز برای یک واکنش آنزیمی با حجم کلی ۳۲ میکرولیتر

Table 2. Enzymatic reaction components in a total volume of 32 μl

Material	Volume in one reaction
PCR Product	10 μl
H ₂ O ₂ dd	18 μl
10 X buffer R	2 μl
Enzyme	2 μl

جدول ۵. نام و توالی پرایمرهای بکار برده شده در روش dCAPS

Table 5. dCAPS Primer sequences

Primers	Sequence 3'-5'	Reference
NsiI1781f	CTGTCTGAAGAAGACTATGGCCG	Yu <i>et al</i> (2007)
NsiI1781r	AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGCA	
ACCF1	CACAGACCATGATGCAGCTC	Kaundun & Windass (2006)
EcoRV2078r	GCACTCAATGCGATCTGGATTTATCTTGATA	

جدول ۶. آنزیم‌های بررسی استفاده شده در روش dCAPS

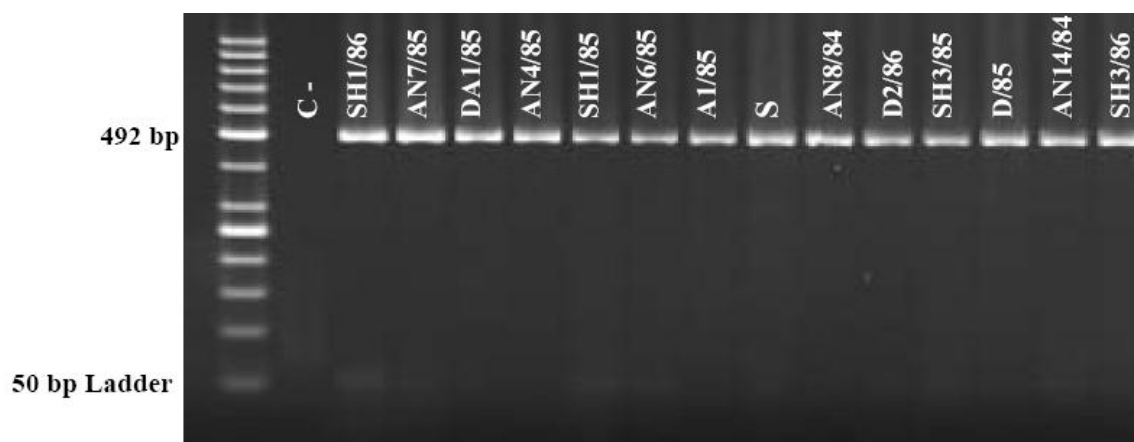
Table 6. Restriction enzymes were used in dCAPS method

Enzyme	Isoschizomers	Site of restriction
NsiI	BfrBI, Csp68KIII, EcoT22I, PinBI, Ppu10I, SepI, SspD5II, Zsp2I	5'-ATGCA [^] T-3' 3'-T [^] ACGTA-5'
EcoRV	-	5'-GAT [^] ATG-3'

نتایج و بحث

جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین: جهش نوکلئوتید تیمین (T) به آدنین (A) در کدن ۲۰۴۱ در ژن ACCase پلاستییدی باعث تغییر ایزولوسین (Ile) به آسپاراژین (Asn) می شود که مکان برشی آنزیم EcoRI را از بین می برد. بنابراین از جفت پرایمر ACCF1/ACCR1 (جدول ۳) برای تکثیر قطعه ۴۹۲ جفت بازی استفاده شد و به دنبال آن برش توسط آنزیم EcoRI (جدول ۴) صورت گرفت (Yu *et al.*, 2007). تکثیر قطعه ۴۹۲ جفت بازی توسط جفت پرایمر ACCF1/ACCR1

نتایج حاصل از تعیین کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که در تمامی بیوتیپ‌ها، نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ در محدوده ۲-۸/۱ ب بود که این نشان دهنده کیفیت مطلوب DNA است. همچنین الکتروفورز DNAها بر روی ژل آگارز نشان دهنده عدم شکستگی و کیفیت مطلوب DNAهای به دست آمده بود (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی توانایی DNAهای استخراج شده در تولید باند ۴۹۲ جفت بازی در واکنش PCR

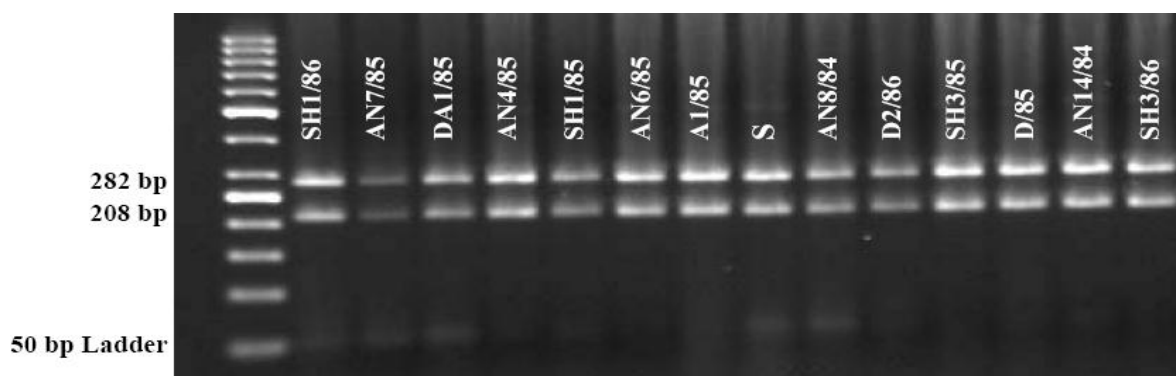
Figure 1. Assess the ability of the extracted DNA produce a 492- bp band PCR product.

قطعه ۴۹۲ جفت بازی، توسط آنزیم برشی *Eco47III* (جدول ۴) نیز مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. گیاهان هموزیگوس حساس با دو آلل ۲۰۸۸-سیستین دارای یک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی می‌باشند. گیاهان هموزیگوس مقاوم دارای دو آلل ۲۰۸۸-آرژنین دو باند قابل هضم در ۱۴۱ و ۳۵۱ جفت بازی نشان می‌دهند و گیاهان هتروزیگوس با هر دو آلل جهش یافته و وحشی، دارای هر سه باند می‌باشند (Yu et al., 2007).

نتایج حاصل از برش آنزیمی *Eco47III* نشان داد که همه بیوتیپ‌ها یک باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی دارند (شکل ۳). بنابراین کل‌یه بی‌وتی‌پ‌های مورد بررسی فاقد جهش سیستین-۲۰۸۸-آرژنین بوده و در واقع حساس هموزیگوس بودند.

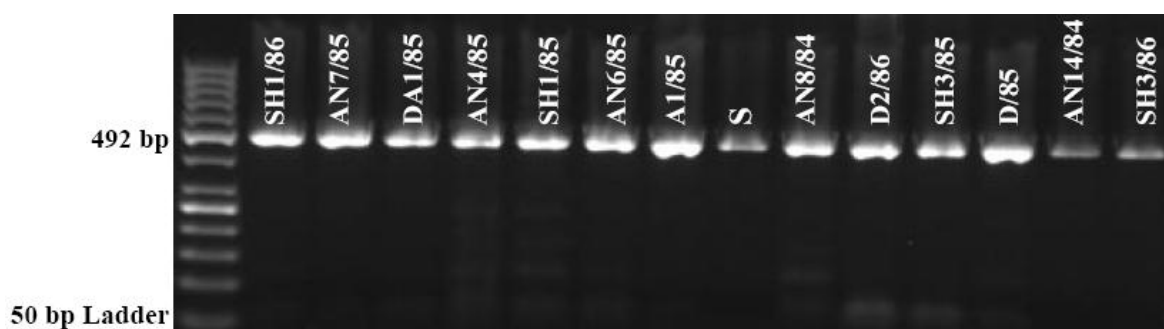
به خوبی انجام گرفت که در شکل ۲، قطعه تک‌تیری شده در بیوتیپ‌های مورد بررسی نشان داده شده است. سپس محصولات PCR توسط آنزیم برشی *EcoRI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. در برش آنزیمی، گیاهان حساس هموزایگوت دو باند هضم شده ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی، گیاهان مقاوم هموزایگوت باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی و گیاهان مقاوم هتروزیگوت هر سه باند را نشان می‌دهند (Yu et al., 2007). نتایج حاصل از برش آنزیم محصولات PCR بیوتیپ‌های مورد بررسی نشان‌دهنده وجود دو باند هضم شده ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی بود (شکل ۲). بنابراین در هی‌چکدام از بی‌وتی‌پ‌ها جهش ایزولوسین-۲۰۴۱-آسپاراژین صورت نگرفته است.

جهش سیستین-۲۰۸۸-آرژنین: به منظور بررسی جهش سیستین-۲۰۸۸-آرژنین، محصولات PCR حاصل از تکثیر



شکل ۲. نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی *EcoRI*

Figure 2. Wild oat biotypes PCR products were digested with *EcoRI* restriction enzyme

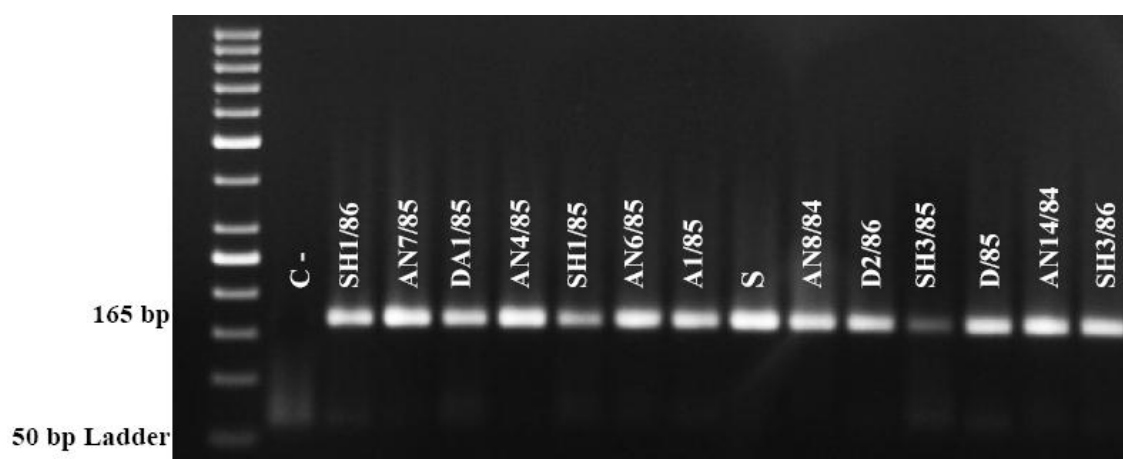


شکل ۳. نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی *Eco47III*

Figure 3. Wild oat biotypes PCR products were digested with *Eco47III* restriction enzyme

باند هضم نشده ۱۶۵ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت دارای هردو آلل ۱۷۸۱-ایزولوسین و ۱۷۸۱-لوسین، هر دو باند فوق را نشان می‌دهند (Kaundun Windass, 2006). نتایج حاصل از هضم آنزیمی بیوتیپ‌های مقاوم و حساس نشان داد که بیوتیپ‌های AN7/85, DA/85, AN4/85, AN6/85, AN8/85, D2/86, AN14/84 دارای دو باند ۱۳۰ جفت بازی و ۱۶۵ جفت بازی می‌باشند (شکل ۵)، که نشان‌دهنده آن است که این بیوتیپ‌ها، مقاوم هتروزیگوت می‌باشند و در آنها جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین رخ داده است. در سایر بیوتیپ‌های مقاوم، مانند بیوتیپ حساس تنها یک باند ۱۳۰ جفت بازی وجود داشت (شکل ۵). بنابراین این بیوتیپ‌ها حساس هموزیگوت بودند.

جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین: تغییر اسید آمینه ایزولوسین به لوسین با جهش نوکلئوتید آدینین (A) به تیمین (T) و یا آدینین (A) با سیتوزین (C) در کدن ۱۷۸۱ اتفاق می‌افتد (Kaundun & Windass, 2006). بنابراین از پرایمرهای NsiII781f /NsiII781781r (جدول ۵) جهت تکثیر قطعه ۱۶۵ جفت بازی استفاده شد. تکثیر قطعه ۱۶۵ جفت بازی توسط پرایمرهای NsiII781f/NsiII781781r در همه بیوتیپ‌ها به خوبی صورت گرفت (شکل ۴). سپس آنزیم برشی *NsiI* (جدول ۶)، برای هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. در هضم آنزیمی توسط آنزیم برشی گیاهان هموزیگوت حساس دارای آلل‌های ۱۷۸۱-ایزولوسین، باند هضم شده ۱۳۰ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت مقاوم دارای آلل‌های ۱۷۸۱-لوسین،



شکل ۴. ارزیابی توانایی DNAهای استخراج شده در تولید باند ۱۶۵ جفت بازی در واکنش PCR

Figure 4. Assess the ability of the extracted DNA produce a 165- bp band PCR product.

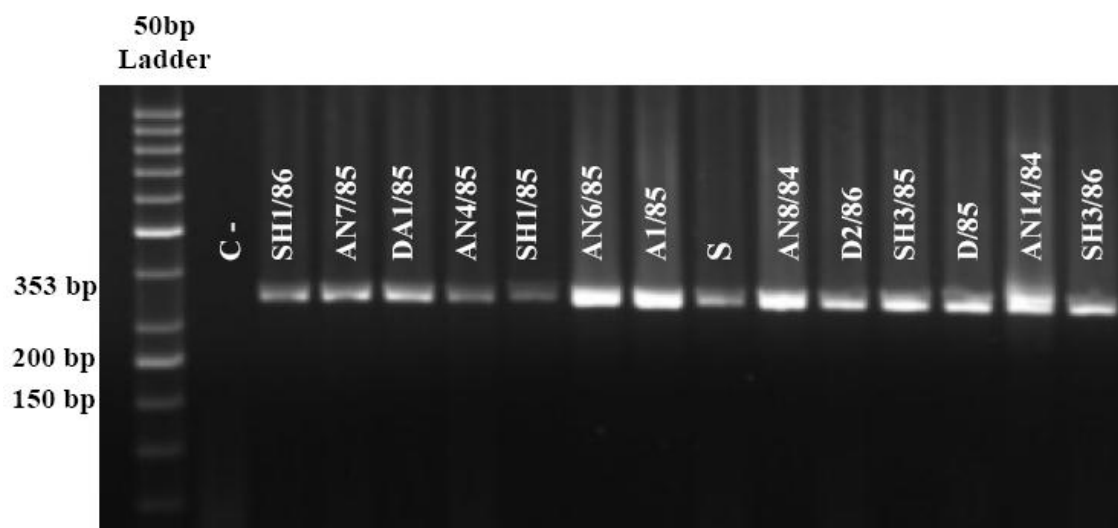


شکل ۵. نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی *NsiI*

Figure 5. Wild oat biotypes PCR products were digested with *NsiI* restriction enzyme.

مقاوم نیز هردو باند را دارند (Yu *et al.*, 2007). نتیجه هضم آنزیمی در بیوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که در بین بیوتیپ‌های مقاوم تنها بیوتیپ AN7/85 دارای دو باند ۳۲۳ و ۳۵۳ جفت بازی دارد که نشان دهنده مقاوم بودن هتروزیگوت این بیوتیپ است (شکل ۷). اما سایر بیوتیپ‌های مقاوم مانند بیوتیپ حساس تنها یک باند ۳۲۳ جفت بازی داشتند (شکل ۷). در نتیجه این بیوتیپ‌ها حساس هموزیگوت هستند.

اسید اسپارتیک-۲۰۷۸-گلایسین: به منظور بررسی جهش اسپارتیک اسید-۲۰۷۸- گلایسین ابتدا توسط جفت پرایمر ACCF1/ EcoRV2078r قطعه ۳۵۳ جفت بازی برای همه بیوتیپ‌ها تکثیر شد (شکل ۶). در نتیجه هضم قطعه تکثیر شده توسط آنزیم EcoRV گیاهان هموزیگوس حساس با آلل های ۲۰۷۸-اسپارتیک اسید دارای یک باند هضم شده ۳۲۳ جفت بازی می‌باشند. گیاهان هموزیگوس مقاوم با آلل‌های ۲۰۷۸-گلایسین دارای یک باند برش نخورده ۳۵۳ جفت بازی می‌باشند، در حالیکه گیاهان حاوی هردو آلل حساس و



شکل ۶. ارزیابی توانایی DNAهای استخراج شده در تولید باند ۳۵۳ جفت بازی در واکنش PCR

Figure 6. Assess the ability of the extracted DNA produce a 353- bp band PCR product.



شکل ۷. نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی EcoRV

Figure 7. Wild oat biotypes PCR products were digested with EcoRV restriction enzyme.

آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز در این گونه‌ها می‌باشد (De'lye & Michel, 2005; De'lye et al., 2002a). جانیشینی (Ile-1781-Leu) باعث مقاومت بیشتر علف‌کش‌های فوپ و بعضی از علف‌کش‌های دیم می‌شود (Zagnitko et al., 2001; Tal & Rubin, 2004; White et al., 2005). نشان می‌دهد که جهش در ناحیه ۱۷۸۱ از اهمیت و عمومیت بیشتری در بین گونه‌ها برخوردار است (De'lye et al., 2005). این جایگزینی در جمعیت‌های مقاوم چندین گونه علف‌هرز شامل *L. rigidum* (Zagnitko et al., 2001; Tal & Rubin, 2004; *L. multiflorum*, Zhang & Powles, 2006a) (White et al., 2005) *A. fatua*، (Christoffers et al., 2002) *S. viridis*، (Liu et al., 2007) *A. sterilis* و (De'lye et al., 2002c) *A. myosuroides* گزارش شده است. (De'lye et al., 2002b; Brown et al., 2002) نیز در مکان ۲۰۷۸ گزارش شده است. تبدیل آسپارتیک اسید به گلایسین در مکان ۲۰۷۸ نیز در علف‌های هرز *A. myosuroides* (De'lye et al., 2005) *A. sterilis* و (Liu et al., 2007) *L. rigidum* گزارش شده است. ژانگ و پاولز (Zhang & Powles, 2006a)، روش تکثیر وابسته به آل را در *L. rigidum* جهت شناسایی جهش جانیشینی لوسین بجای ایزولوسین به‌عنوان روشی مناسب برای تشخیص مقاومت مبتنی بر هدف معرفی کردند. کاندان و وینداس (Kaundun & Windass, 2006)، علیرغم گستردگی استفاده از این روش جهت شناسایی جهش نقطه‌ای یاد شده، با اعمال تغییراتی در روش CAPS، روش dCAPS را جهت شناسایی جهش نقطه‌ای در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیم آ معرفی کردند، همچنین مشخص شد، کارایی این روش در مقایسه با روش تکثیر وابسته به آل بیشتر است چون اولاً این روش قادر به تشخیص فرم‌های هموزیگوس و هتروزیگوس بوده ثانیاً قابل تعمیم به همه علف‌های هرز باریک برگ می‌باشد، پس میتوان این روش را به منظور تشخیص مقاومت و مکانیزم ایجاد کننده آن در همه علف‌های هرز باریک برگ در کمترین زمان ممکن و برای نمونه‌های زیاد به کار برد.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ۵۳/۸ درصد بیوتیپ‌های مقاوم به بازدارنده‌های ACCase دارای جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و ۷/۶ درصد بیوتیپ‌ها دارای جهش آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلایسین می‌باشند. بیوتیپ AN7/85 تنها بیوتیپی بود که دارای دو جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و آسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلایسین بود. سایر بیوتیپ‌های مقاوم نیز احتمالاً یا دارای جهش‌های دیگری غیر از ۴ جهش مورد بررسی می‌باشند که احتمال آن با توجه به بررسی منابع بسیار ضعیف است و در حال حاضر روش dCAPS و CAPS نیز برای آنها طراحی نشده است و یا مکانیزم مقاومت آنها براساس غیر محل هدف علف‌کش (عمده ترین آن افزایش متابولیسم) می‌باشد. زند و همکاران (Zand et al., 2013)، گزارش کردند از بین ۱۷ توده یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش‌های ACCase مورد بررسی، علت مقاومت ۵۰ درصد از توده‌های مورد مطالعه جهش در موقعیت ۱۷۸۱، ۱۰ درصد جهش در موقعیت ۲۰۴۱ و ۱۰ درصد جهش در جایگاه ۲۰۷۱ و ۱۷۸۱ کربوکسیل ترانسفراز آنزیم استیل کوآنزیم-آ کربوکسیلاز بود. قرخلو (Gherekhloo, 2008)، دلیل مقاومت برخی از توده‌های فالاریس (*Phalaris minor*) را به طیفی از علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات، در نتیجه بروز جهش در جایگاه ۲۰۷۸ آنزیم ACCase گزارش کرده است.

نمونه‌های زیادی از مقاومت ACCase‌ها گزارش شده است که به علت جهش‌های محل هدف است (Preston & Mallory-Smith, 2001). جانشین شدن اسید آمینه لوسین بجای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ (شماره گذاری شده براساس توالی *Alopecurus myosuroides* در محل کربوکسیل ترانسفراز (CT) آنزیم استیل کوآنزیم آ پلاستیدی، یک جهش نقطه‌ای کلیدی عامل مقاومت به اغلب علف‌کش‌های فوپ و دیم در گونه‌های علف‌هرز باریک برگ می‌باشد. این امر حاصل جهش و تبدیل آدنین (A) به تیمین (T) و سیتوزین (C) در نوکلئوتید شماره ۵۳۴۱ در توالی کد کننده

منابع

- Barth, S., Melchinger, A.E. and Luebbeastedt, T. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 11:495-505.
- Beckie, H.J. and Kirkland, K. J. 2003. Implication of reduced herbicide rates on resistance enrichment in wild oat (*Avena fatua*). *Weed Technol.* 17:138-148.
- Benakashani, F., Zand, E. and Naghavi, M. R. 2010. Investigation of the cross resistance to ACCase inhibitor herbicides in wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) populations from Khuzestan province and chemical control of resistant populations. *Iran. J. of Weed Sci.* 6 (1):95-112.
- Bourgeois, L., Kenkel, N.C. and Morrison, I.N. 1997. Characterization of cross resistance patterns in acetyl-CoA carboxylase inhibitor resistant wild oat (*Avena fatua*). *Weed Sci.* 45:750-755.
- Bradley, K.W., Wu, J., Hatzios, K.K. and Hagood, E.S. 2001. The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in a Johnsongrass biotype. *Weed Sci.* 49: 477-484.
- Brown A.C., Moss, S.R., Wilson, Z.A. and Field, L.M. 2002. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black grass) is associated with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pestic Biochem Phys.* 72:160-168.
- Christoffers M.J., Berg, M.L. and Messersmith, C.G. 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome.* 45:1049-1056.
- Christoffers, M.J. 1999. Genetic aspects of herbicide resistant weed management. *Weed Technol.* 13: 647-652.
- Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology.* 1:233-240.
- De'lye C., Zhang, X.Q., Michel, S., Mate'jicek, A. and Powles, S. B. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiol.* 137:794-806.
- De'lye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* 53:728-746.
- De'lye, C. and Michel, S. 2005. 'Universal' primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Res.* 45:323-330.
- De'lye, C., Calmes, E. and Mate'jicek, A. 2002a. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) genotypes resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides. *Theor Appl Genet.* 104:1114-1120.
- De'lye, C., Mate'jicek, A. and Gasquez, J. 2002b. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest manag Sci.* 58:474-478.
- De'lye, C., Wang, T.Y. and Darmency, H. 2002c. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta.* 214:421-427.
- De'lye, C., Zhang, X.Q., Chalopin, C., Michel, S. and Powles, S.B. 2003. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiol.* 132:1716-1723.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry.* 19:11-15.
- Gherekhlou, J., Rashed Mohassel, M. H., Nasiri Mahalati, M., Zand, E., Ghanbari, A., Osuna, M.D., Ruiz-Santaella, J. P., Wagner, J. and De Prado, R. 2008. ACCase mutations confer ACCase resistance in two *Phalaris minor* populations from Iran. The proceeding of the 5th International Weed Sci. Vancouver, Canada.
- Hassan, C., Muller-Warrant, G. and Griffith, S. 2002. Differential sensitivity of Italian ryegrass (*Lolium Multiflorum*) cultivars to fenoxaprop. *Weed Sci.* 50:567-575.
- Kaundun, S.S. and Windass, J.D. 2006. Derived cleaved amplified polymorphic, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* 46:34-39.

- Kuk, Y.I., Burgos, N.R. and Talbert, R.E. 2000. Cross - and multiple resistance of diclofop- resistant *Lolium* spp. Weed Sci. 48:412-419.
- 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 carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:3627-3632.
- Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J. and Pepper, A.E. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. Plant J. 14:387-392.
- Powles, S.B., Peterson, C., Bryan, I.B. and Jutsum, A.R. 1997. Herbicide resistance: Impact and management. Adv. Agron. 58:57-93.
- Preston, C. and Mallory-Smith, C.A. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. Pages 23-60 in S. B. Powles and D. L. Shaner, eds. Herbicide resistance and world grains. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Seefeldt, S.S., Gealy, 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. 42:430-437.
- Tal, A. and Rubin, B. 2004. Molecular characterization and inheritance of resistance to ACCase herbicides in *Lolium rigidum*. Pest Manag. Sci. 60:1013-1018.
- Uludag, A., Park, K.W., Cannon, J. and Mallory-Smith, A. 2008. Cross resistance of Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibitor-resistant wild oat (*Avena fatua*) biotypes in the Pacific Northwest. Weed Technol. 22:142-145.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P. and Powles, S. B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. New Phytol. 184:751-767.
- White, G.M., Moss, S.R., Karp, A. 2005. Differences in the molecular basis of resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim in *Lolium multiflorum*. Weed Res. 45:440-448.
- Yu, Q., Collavo, A., Zheng, M.Q., Owen, M., Sattin, M. and Powles, S. B. 2007. Diversity of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Mutation in Resistant *Lolium* Populations: Evaluation Using Clethodim. Plant Physiol. 145:547-558.
- Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R. and Gornicki, P. 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl- CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. Proc National Academy Science, USA 98:6617-6622.
- Zand, E., Razmi, A., Benakashani, F., Nezamabadi, N., Gharkhloo, J. and Sasanfar, H.M. 2013. Using CAPS and dCAPS methods to detect some mutations that cause resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in wild oat (*Avena ludoviciana*). Iran. J. of Weed Sci. 9:79-91.
- Zhang, X.Q. and Powles, S.B. 2006a. Six amino acid substitutions in the carboxyltransferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population. New Phytol. 172:636-645.
- Zhang, X.Q. and Powles, S.B. 2006b. The molecular bases for resistance to acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides in two target based resistant biotypes of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). Planta. 223:550-557.

Mutations in Acetyl-CoA Carboxylase Enzyme, Mechanism of Cross Resistance in Wild Oat (*Avena ludoviciana* Deuri.) Biotypes to ACCase Inhibitor Herbicides

Fatemeh Benakashani¹, Eskandar Zand², Mohammad Reza Naghavi³ and Hamidreza Sasanfar⁴

1- Institute of Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R.Iran 2- Department of Weed Science, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, I.R.Iran 3- College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran 4- Department of Agronomy, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

In order to detect the probability of ACCase inhibitor herbicides target-site based resistance of 13 wild oat (*Avena ludoviciana* Deuri.) biotypes, molecular experiments were performed using CAPS and dCAPS methods. Biotypes were collected from khuzestan province and which showed cross-resistance to ACCase inhibitors. The above-mentioned molecular methods were used to identify the locations of four important mutations (Isoleucine-2041-Asparagine, Cysteine-2088-Arginine, Isoleucine-1781-Leucine and Aspartic acid-2078-Glycine) responsible for target site based herbicide resistance in the carboxyltransferase domain of ACCase enzyme. Both approaches involve DNA extraction, PCR using specific primers and restriction digests of PCR products with restriction enzymes. Results of experiments showed that Isoleucine-1781-Leucine and Aspartic acid-2078-Glycine mutations were observed in 53.8% and 7.6% of resistant wild oat biotypes, respectively. Among the investigated biotypes, only one biotype had two mutations (Isoleucine -1781-Leucine and Aspartic acid-2078-Glycine). Thus, different mutations in the carboxyl transferase domain of ACCase enzyme were the reason of various cross resistance patterns among wild oat biotypes.

Key words: Mutation, Target site-based resistance, ACCase enzyme, CAPS, dCAPS