مجله دانش علف‌های‌هرز

مجله دانش علف‌های‌هرز (۲) ٦ (۱۳۸۹) ۸۹- ۷۹

مطالعه مکانیسم‌های مقاومت غیر مبتنی بر محل هدف در بیوتیپ‌های فالاریس (*Phalaris minor* Retz.) مقاوم به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات

جاوید قرخلو*[۱]، محمدحسن راشدمحصل[۲]، مهدی نصیری محلاتی[۲]، اسکندر زند[۳]، علی قنبری[۲] و رافائل دپرادو[٤]

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۲-دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ۳- موسسه تحقیقات، آفات و بیماریهای گیاهی ۴- دانشگاه کوردوبا اسپانیا

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۰

تاریخ پذیرش : ۹۰/۳/٤

چکیده

بازدارنده‌های استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز، علف‌کش‌های رایج برای کنترل پس‌رویشی علف‌های هرز باریک‌برگ در مزارع گیاهان پهن‌برگ می‌باشند. تعدادی از این علف‌کش‌ها برای کنترل علف‌های هرز باریک‌برگ در مزارع گندم و جو استفاده می‌شود. اخیرا چند بیوتیپ از علف هرز فالاریس مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات از جمله دایکوفوپ متیل، فنوکساپروپ پی اتیل و کلودینافوپ پروپارژیل در برخی مزارع گندم استان فارس که سالهای متمادی در معرض تیمار با این باریک‌برگ‌کش بودند، شناسایی شده است. مطالعات قبلی بیوشیمیایی نشان داد که مکانیسم مقاومت به این علف‌کش‌ها در بیوتیپ‌های SR3، MR4 و AR بدلیل وجود آنزیم تغییر یافته ACCase می‌باشد. اما میزان حساسیت این آنزیم در سایر بیوتیپ‌های مقاوم (FR2, FR3, GR2-1وFR4,FR5, FR6, FR8, MR1, MR2, ER1, ER2) تفاوت معنی‌داری با بیوتیپ حساس نداشت. آزمایشهایی برای تعیین میزان نهشت، جذب و انتقال علف‌کش دایکلوفوپ متیل در دو بیوتیپ مقاوم SR3 و FR8 و بیوتیپ حساس ES در سال ۱۳۸۷ در آزمایشگاه شیمی کشاورزی دانشگاه کوردوبای اسپانیا انجام شد تا مکانیسم یا مکانیسم‌های احتمالی مقاومت غیر مبتنی بر محل هدف در این بیوتیپ‌ها مورد مطالعه قرار گیرد. میزان نهشت و جذب علف‌کش دایکلوفوپ متیل در دو بیوتیپ مقاوم تفاوت معنی‌داری با بیوتیپ حساس نشان نداد. در هر سه بیوتیپ ، عمده علف‌کش جذب شده، در برگ تیمار شده باقی ماند و میزان بسیار ناچیزی به سایر بخشهای گیاه منتقل شد. میزان متابولیسم علف‌کش نیز در هر سه بیوتیپ یکسان بود. از آنجاییکه بیوتیپ FR8 فاقد آنزیم مقاوم بوده و از طرف دیگر میزان نهشت، جذب، انتقال و متابولیسم علف‌کش نیز در آن تفاوت معنی‌داری با بیوتیپ حساس نشان نداد، احتمالا مکانیسم ناشناخته‌ای در مقاومت این بیوتیپ دخیل می‌باشد.

واژگان کلیدی: انتقال، جذب، نهشت و متابولیسم

* Correspondence to : gherekhloo@yahoo.com

مقدمه

رایج‌ترین روش برای کنترل علف‌های هرز باریک برگ در مزارع گندم، استفاده از بازدارنده‌های آنزیم استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز[1] می‌باشد. دو گروه شناخته شده از این علف‌کش-ها عبارتند از آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (APP) و سیکلوهگزاندیون (CHD) که علیرغم ساختمان متفاوت، مکانیسم عمل مشابهی داشته و هر دو مانع عمل ACCase کلروپلاستی می‌شوند (Maneechote *et al*., 2005). آنزیم استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز، پروتئین چندکاره‌ای است (Sasaki & Nagano, 2004; Price *et al*., 2003) که کربوکسیلاسیون استیل کوآنزیمآ به مالونیل کوآنزیمآ را در یک واکنش دو مرحله‌ای برگشت‌پذیر به عهده دارد. این واکنش، اولین مرحله در سنتز اسیدهای چرب می‌باشد (Sasaki & Nagano, 2004). از زمان معرفی بازدارنده‌های ACCase،گونه‌های بسیاری از علف‌های هرز باریک‌برگ به این علف‌کش‌ها مقاوم شده‌اند. بطوریکه کاربرد مداوم این گروه از علف‌کش‌ها منجربه بروز مقاومت در ٤٠ گونه علف هرز باریک‌برگ در دنیا شده است (Heap, 2011). تاکنون چهار مکانیسم اصلی برای توجیه مقاومت به بازدارنده‌های ACCase در علف‌های هرز پیشنهاد شده است (Bradley *et al*., 2001): مقاومت بر پایه تغییر در محل هدف و بدلیل وجود شکل غیر حساس آنزیم ACCase در علف‌های هرز که در اغلب موارد مسئول بروز این مقاومت می‌باشد (Maneechote *et al*., 2005)، افزایش متابولیسم علفکش نیز مکانیسم دیگری است که برای مقاومت به بازدارنده‌های ACCase پیشنهاد شده است (Maneechote *et al*., 2005)، مکانیسم دیگر، پتانسیل الکتروژنی غشا پلاسمایی در قطبیت دوباره، پس از قرار گرفتن در معرض علفکش در بیوتیپ‌های مقاوم می‌باشد (Hausler *et al*., 1991) و در نهایت کاهش جذب و انتقال علف‌کش‌ها بعنوان پتانسیلی برای مکانیسم مقاومت علف‌های هرز به بازدارنده‌های ACCase ذکر شده است (Bradley *et al*., 2001).

در سال‌های اخیر، استفاده متوالی از این گروه از علف‌کش‌ها باعث بروز مقاومت در بیوتیپ‌هایی از یولاف وحشی، فالاریس و چچم در مزارع گندم برخی از استان‌های کشور شده است که به یک یا چند علف‌کش از گروه بازدارنده‌های ACCase مقاوم شده‌اند (Gherekhloo & Zand, 2010). مطالعات گلخانه‌ای نشان داد که برخی از بیوتیپ‌های مقاوم فالاریس جمع آوری شده از مزارع گندم استان فارس و گلستان دارای سطوح متفاوتی از درجه مقاومت به سه علف‌کش دایکلوفوپ متیل، فنوکساپروپ پی اتیل و کلودینافوپ پروپارژیل هستند (Gherekhloo *et al*., 2008). زیست سنجی آنزیم ACCase بیانگر وجود آنزیم تغییر یافته و غیر حساس به علف‌کش‌های یاد شده در سه بیوتیپ AR، MR4 و SR3 از بیوتیپ‌های مورد بررسی بود. سایر بیوتیپ‌ها (FR2, FR3, FR4,FR5, FR6, FR8, MR1, MR2, ER1, ER2 and GR2-1) علیرغم بروز مقاومت، فاقد آنزیم مقاوم بودند (Gherekhloo *et al*., 2011). هدف از این تحقیق، مطالعه مکانیسم یا مکانیسم‌های احتمالی مقاومت غیر مبتنی بر محل هدف از قبیل میزان نهشت، جذب و انتقال و متابولیسم علف‌کش دایکلوفوپ متیل در بیوتیپ SR3 (نماینده بیوتیپ‌های مقاوم دارای آنزیم مقاوم) و بیوتیپ FR8 (نماینده بیوتیپ‌های مقاوم فاقد آنزیم تغییر یافته) بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور بیوتیپ‌های مقاوم فالاریس(FR8 و SR3) طی سال ۱۳۸۵ از سطح مزارع مشکوک گندم استان فارس و بذور بیوتیپ حساس(ES) از مزارعی که سابقه سمپاشی نداشتند، جمع‌آوری شد. به منظور یکنواختی در سبز شدن گیاهچه‌ها، ابتدا بذور در ژرمیناتور جوانه‌دار شد تا واریانس ناشی از عدم همزمانی جوانه‌زنی به حداقل رسانیده شود. بدین منظور خواب بذور علف هرز فالاریس که عمدتا ناشی از پوسته سخت آن می‌باشد، شکسته شد. برای این‌کار ابتدا بذور بمدت ۲/۳۰ دقیقه با اسید سولفوریک غلیظ ۹۸٪ تیمار و سپس با آب مقطر شستشو شد. سپس بذور به پتری‌دیش‌های ۹ سانتیمتری حاوی کاغذ صافی واتمن شماره ۱ منتقل و ۵

[1] -ACCase co-A

میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و به مدت ۵ روز درون یخچال در دمای ثابت ۵ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از آن به ژرمیناتور با شرایط نوری ۱۲/۱۲ و دمای متناوب ۲۵/۱۵ منتقل شد. پس از دو روز اولین نشانه جوانه‌زنی در بذور نمایان شد که در این مرحله بذور برای انجام آزمایشهای مربوط به این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. بذور فالاریس پس از جوانه دار شدن به گلدانهایی به حجم ۳۰۰ سانتیمتر مکعب، حاوی ورمی کولیت منتقل شده و در اطاقک رشد با شرایط نوری ۱٤/۸ و دمای متناوب ۳۰/۲۰ ، نگهداری تا به مرحله ۳ تا ٤ برگی رسیدند.

آزمایش میزان نهشت[1] علف‌کش

این آزمایش به منظور بررسی میزان نهشت علف‌کش بر روی بیوتیپ حساس(ES) و دو بیوتیپ مقاوم (FR8 و SR3) فالاریس با سه تکرار(گلدان) و هر تکرار شامل ٤ گیاه انجام شد. در این رابطه از محلول فلوئورسانس به عنوان شاخصی جهت اندازه‌گیری کمی میزان علف‌کش نهشت یافته استفاده شد (Michitte *et al*, 2007; Richardson, 1984). بدین منظور دستگاه سمپاش خودکار با نازل یکنواخت ۸۰۰۱ برای پاشش ۹۰۰ گرم ماده موثره دایکلوفوپ متیل با ۲۵۰ لیتر آب در هکتار کالیبره گردید. ۱۹۸ میلی‌لیتر محلول سم بر اساس دز توصیه شده تهیه و به آن ۲ میلی لیتر از محلول سدیم-فلوئورسئین ۵ میلی مولار افزوده شد. گیاهچه‌های فالاریس در مرحله ۳ تا ٤ برگی با محلول سم و فلوئورسئین تهیه شده، مورد تیمار سمپاشی قرار گرفتند. بعد از خشک شدن قطرک‌های سم بر روی برگ، گیاهچه فالاریس را از محل یقه قطع و در داخل استوانه مدرج حاوی۵۰ میلی لیتر از محلول سود ۵ میلی مولار گذاشته و هم زده تا سدیم-فلوئورسئین روی برگها شسته شود. سپس مایع حاصل به درون ویال های مخصوص و گیاهچه‌های فالاریس به پاکت‌های کاغذی منتقل شد. پاکت‌های حاوی گیاهچه‌ها به مدت ٤۸ ساعت به آون با دمای۶۰ درجه سانتیگراد منتقل تا خشک شوند. ویال‌ها نیز به دستگاه اسپکتروفلوئورومتر[2] منتقل تا میزان فلوئورسئین درون آنها در دامنه طول موج ۵۱۰ / ٤۹۰ نانومتر، اندازه‌گیری شود. با استفاده از اعداد بدست آمده، میزان علف‌کش نهشت یافته به ازاء واحد وزن خشک گیاه فالاریس محاسبه گردید. این آزمایش با شرایط اشاره شده و کالیبراسیون دستگاه سمپاش برای پاشش ۶۷/۵ گرم ماده موثره فنوکساپروپ پی اتیل به منظور بررسی میزان نهشت علف‌کش پوماسوپر تکرار شد.

آزمایش میزان جذب[3] یا نفوذ[4] علف‌کش

این آزمایش به منظور بررسی میزان جذب علف‌کش توسط گیاهچه‌های فالاریس و میزان انتقال آن در پیکره گیاه در بیوتیپ‌های SR3، FR8 و ES صورت گرفت. بدین منظور ابتدا بذور فالاریس جوانه‌دار شده، سپس درون هر گلدان حاوی تورب[5]، یک بذر جوانه‌دار کشت شد. هر گلدان به منزله یک تکرار در نظر گرفته شده و آزمایش در ۶ زمان و ۳ تکرار در هر زمان انجام شد. برای انجام آزمون، ابتدا میزان ^{14}C (کربن نشاندار[6]) موجود در واحد حجم علف‌کش نشاندار دایکلوفوپ متیل (تهیه شده از شرکت بایرکراپ ساینس[7]) اندازه‌گیری شد. سپس محلول علف‌کش دایکلوفوپ متیل بر اساس دز توصیه شده (یعنی ۲/۵ لیتر علف‌کش ایلوکسان در ۲۵۰ لیتر آب) تهیه شد. سپس با توجه به میزان ^{14}C موجود در علف‌کش نشاندار، اختلاط آن با علف‌کش تجاری بنحوی صورت گرفت که در هر ۱/۵ میکرولیتر میزان dpm ۵۰۰۰۰ کربن نشاندار موجود باشد. در مرحله سه برگی با سرنگ همیلتون[8] دو قطرک هر کدام به میزان ۱/۵ میکرولیتر از مخلوط علف‌کش به فاصله حدود یک سانتیمتری از انتهای برگ دوم در دو طرف رگبرگ میانی و بر روی سطح برگ گذارده شد. در مجموع ۳ میکرولیتر علف‌کش حاوی dpm

[1] - Retention

[2] -Spectro-Flourometer
[3]- Absorption
[4] -Penetration
[5] -Turb
[6] - Radiolabeled
[7] -Bayer CropScience
[8] -Hamilton-HB

۱۰۰۰۰۰ کربن نشاندار بر روی برگ دوم گیاهچه فالاریس اعمال شد. پس از تیمار گیاهچه‌های فالاریس با علف‌کش، اندازه‌گیری ^{14}C در زمان‌های مورد نظر یعنی ۱۲ ، ۲٤ ، ۱۲۰، ۱٦۸، ۲۱٦ و ۲٦۸ ساعت پس از اعمال علف‌کش انجام شد. بدین منظور هر برگ تیمار شده یک بار با یک میلی‌لیتر استن و بار دیگر با یک میلی‌لیتر کلروفرم شسته و محلول‌های حاصل در ویال‌های جداگانه ۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. سپس به هر ویال ٤ میلی‌لیتر، Scintillation Cocktail افزوده و پس از هم زدن به دستگاه شمارشگر منتقل تا میزان محتوای ^{14}C درون این ویال‌ها اندازه‌گیری شود. جمع مقادیر عددی بدست آمده برای دو ویال یاد شده بیانگر میزان ^{14}C و نتیجتاً علف‌کشی بود که توسط گیاه جذب نشده است.

آزمون انتقال علف‌کش

انتقال علف‌کش[1] به دو صورت کمی و کیفی مطالعه شد:

مطالعه کمی: پس از شستشوی برگها و اندازه‌گیری میزان کربن نشاندار در آزمایش قبل، گیاهچه‌های فالاریس به سه قسمت ریشه، برگ تیمار شده با علف‌کش و بقیه اندام‌های هوایی تقسیم و درون فنجانک‌های کوچک کاغذی نهاده و به مدت ٤۸ ساعت درون آون با دمای ٦۰ درجه سانتیگراد گذاشته شدند. سپس هر یک از فنجانک‌ها بطور جداگانه به دستگاه اکسیدایزر[2] منتقل و در دمای ۱۲۰۰درجه سانتیگراد سوزانده شده و دی اکسید کربن حاصل پس از جذب توسط محلول‌های CARBO SORB-E و PERMAFLOUR، درون ویال مخصوص ۲۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. پس از این مرحله ویال‌ها به دستگاه شمارشگر منتقل تا محتوای ^{14}C اندازه‌گیری شود (Seefeldt *et al*. 1996).

مطالعه کیفی: با استفاده از دستگاه سایکلون[3] جهت و میزان حرکت علف‌کش در پیکره گیاه مورد بررسی دیداری و کیفی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش پس از شستشوی برگ تیمار شده (مانند آزمایش جذب علف‌کش) به آهستگی، ریشه گلدان‌ها به اطاقک رشد بازگردانده شد.

گیاه را با آب شسته تا عاری از تورب شود، سپس گیاه فالاریس روی کاغذ صافی گذاشته شده و بوسیله نوار چسب ثابت شد. مجموعه گیاه و کاغذ صافی به مدت ٤۸ ساعت به داخل آون ٦۰ درجه سانتیگراد منتقل تا خشک شد. سپس فیلم مخصوص دستگاه سایکلون روی گیاه فالاریس خشک شده قرار گرفته و توسط قابی به آن، ثابت شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت فیلم را از روی گیاه برداشته و بر روی استوانه مخصوص درون دستگاه سایکلون ثابت نموده تا دستگاه از پیکره گیاه عکس رادیوگرافی تهیه کند (Perez-Jones *et al*. 2007).

متابولیسم علف‌کش

مطالعه متابولیسم علف‌کش بصورت غیر مستقیم انجام شد.آنزیم سیتوکروم پی ٤۵۰ [4] از طریق متابولیسم علف‌کش‌ها علف‌کش‌ها و تبدیل آنها به متابولیت‌های ثانویه مانع فعالیت علف‌کشی آنها می‌شود. [5] ABT و [6] PBO دو ماده شیمیایی هستند که از فعالیت آنزیم سیتوکروم پی ٤۵۰ اکسیژناز ممانعت بعمل می‌آورند (Letouze, & Gasquez, 2001). برای انجام این آزمایش تیمارهای زیر بصورت فاکتوریل ترکیب و آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

علف‌کش دایکلوفوپ متیل در دو سطح صفر(شاهد یا آب مقطر) و دز EC_{50} برای بیوتیپ حساس معادل ۲/٤٤ میلی گرم ماده موثره در لیتر (Gherekhloo, 2008).

بازدارنده‌های Cyt P450 در سه سطح صفر(آب مقطر)، ۱۰ میلی‌گرم ABT در یک لیتر آب مقطر و ۲۰ میکرولیتر PBO مقطر در یک لیتر آب مقطر(Letouze, & Gasquez, 2001؛ Letouze, & Gasquez, 1999).

تعداد ۱۰ عدد بذر جوانه‌دار شده فالاریس به پتری‌دیش‌های ۹ سانتیمتری و روی کاغذ صافی واتمن شماره۱ منتقل و سپس

[1] -Herbicide translocation
[2] - Oxidizer
[3] - Cyclone
[4] - Cytochrome P450 (Cyt P450)
[5] - Amino Benzo Triazole
[6] - Piperonylbutoxide

تیمارهای اشاره شده با افزودن ۸ میلی‌لیتر از هر یک از محلولهای تهیه شده به پتری‌دیش‌ها اعمال شد. هفت روز پس از اعمال تیمارها، طول ساقه چه گیاهچه‌های فالاریس اندازه‌گیری و بر حسب درصد نسبت به شاهد بیان شد.

نتایج و بحث

نهشت علف‌کش

بیوتیپ‌های مقاوم و حساس فالاریس تفاوت معنی‌داری در مقابل نهشت فرم تجاری علف‌کش‌های دایکلوفوپ متیل و فنوکساپروپ پی اتیل از خود نشان ندادند. نتایج نشان داد که میزان نهشت علف‌کش دایکلوفوپ بر روی بیوتیپ‌های حساس ۱۶/۶۸ میکرولیتر به ازاء هر گرم وزن خشک برگ آن می‌باشد. در حالیکه این مقدار برای بیوتیپ‌های FR8 و SR3 بترتیب ۱۴/۵۰ و ۱۳/۶۵ میکرولیتر به ازاءهر گرم وزن خشک برگ بود. البته اعداد بدست آمده از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۱). با اینکه میزان نهشت علف‌کش فنوکساپروپ بیشتر از دایکلوفوپ بود ولی از این نظر اختلافی بین بیوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۱). این نتایج حاکی از آن است که مقاومت در بیوتیپ‌های مقاوم به دلیل تفاوت در نهشت علف‌کش بر روی برگ گیاهان مقاوم و حساس نمی‌باشد.

از آنجایی‌که میزان نهشت علف‌کش عامل تعیین کننده‌ای در میزان جذب علف‌کش توسط گیاه می‌باشد، نقش مهمی در کارایی علف‌کش‌ها داراست (Michitte *et al*., 2007). اصولاً گیاهانی که نهشت علف‌کش بر روی آنها ۴۰۰-۳۰۰ میکرولیتر به ازاء هر گرم وزن خشک باشد، گیاهان آسان خیس شونده[1] نامیده می‌شوند. گیاهانی مانند *Chamomilla recutita* L.، تاجریزی سیاه (*Solanum nigrum* L.) و گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) از این دسته‌اند و به گیاهانی مانند گندم (*Triticum aestivum* L.) و نخود (*Pisum sativum* L.)که میزان نهشت علف‌کش بر روی آنها کمتر از ۵۰ میکرولیتر به ازاء وزن خشک آنها می‌باشد، گیاهان سخت خیس شونده[2] گفته می‌شود (De Ruiter *et al*., 1990).

جدول ۱- میزان نهشت علف‌کش دایکلوفوپ بر حسب میکرولیتر بر گرم وزن خشک فالاریس

Table 1- Retention of diclofop herbicide on *Phalaris minor* Retz. (micro litter /g dry matter)

Biotype / Herbicide	SR3	FR8	ES
diclofop methyl	13.65 ± 3.77	14.50 ± 2.95	16.68 ± 3.04
fenoxaprop-P ethyl	27.75 ± 3.58	31.51 ± 2.95	31.43 ± 4.00

همانطوریکه نتایج نشان می‌دهد میزان نهشت هر دو علف‌کش بر روی گیاهچه‌های فالاریس بسیار اندک بوده که احتمالاً بدلیل ویژگی‌های مورفولوژیکی فالاریس از جمله سطح برگ کم و پرزهای بسیار بر روی سطح برگ می‌باشد و از این نظر جزء گروه گیاهان سخت خیس شونده قرار می‌گیرد. ولی همانگونه که مشاهده می‌شود، تفاوتی از نظر میزان علف‌کش نهشت یافته بین بیوتیپ‌های مقاوم و حساس دیده نمی‌شود، پس این عامل نمی‌تواند دلیلی بر ایجاد مقاومت در بیوتیپ‌های SR3 و FR8 نسبت به بیوتیپ حساس ES باشد. *Gronwald et al.* (1992), طی آزمایشی مکانیسم‌های مقاومتی در تودهٔ *Lolium multiflorum* Lam. مقاوم به دایکلوفوپ متیل را بررسی و گزارش کردند که تفاوتی از نظر میزان نهشت، جذب و انتقال و متابولیسم بین بیوتیپ‌های حساس و مقاوم وجود نداشته و تنها عامل مقاومت را وجود آنزیم استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز تغییر یافته در بیوتیپ مقاوم اعلام کردند.

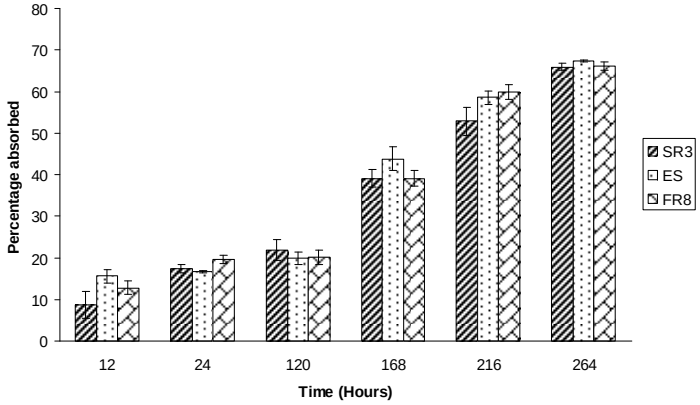
Menendez & De Prado (1996) نیز مقاومت *Alopecurus myosuroides* Huds. به دایکلوفوپ را در نتیجه تغییر در آنزیم استیل کوآنزیمآ در بیوتیپ مقاوم دانسته و تفاوتی در میزان نهشت، انتقال و جذب علف‌کش بین بیوتیپ‌های حساس و مقاوم مشاهده و گزارش نکردند.

جذب علف‌کش

تفاوت معنی‌داری بین میزان جذب و یا نفوذ علف‌کش دایکلوفوپ به درون بافت برگ بیوتیپ‌های حساس و مقاوم

[13] - Easy to wet
[2] - Difficult to wet

علف هرز فالاریس در زمانهای مختلف مشاهده نشد. میزان جذب علف‌کش در هر دو بیوتیپ حساس و مقاوم، پس از اعمال تیمار، روند افزایشی نشان داد (شکل۱) و میزان جذب در روز یازدهم به حداکثر مقدار خود یعنی حدود ۷۰ درصد میزان علف‌کش اعمال شده برای هر دو بیوتیپ حساس و مقاوم رسید.



شکل ۱- میزان جذب علف‌کش دایکلوفوپ متیل نشاندار توسط برگ بیوتیپ‌های حساس و مقاوم فالاریس در زمانهای مختلف پس از تیمار با علف‌کش

Figure 1- Amount of radiolabeled dicolofop methyl absorbed by leaves of susceptible and resistant Phalaris minor Retz. at different times after treatment with herbicide.

انتقال علف‌کش

بررسی کمی انتقال علف‌کش: همانگونه که از جدول ۲ بر می‌آید، در همه بیوتیپ‌ها مقدار بسیار اندکی از علف‌کش دایکلوفوپ به سایر بخشهای هوایی و ریشه گیاهچه‌های فالاریس منتقل شده است، بطوری که در بیوتیپ SR3 صرفاً ۰/۹٦ و ۰/٦۲درصد از علف‌کش جذب شده از برگ تیمار شده بترتیب به سایر اندامهای هوایی و ریشه منتقل شده است. این مقدار برای بیوتیپ حساس ES و مقاوم FR8 نیز تقریباً مشابه می‌باشد.

جدول ۲- میزان علف‌کش انتقال یافته به اندام‌های فالاریس حساس و مقاوم بر حسب درصد از میزان جذب شده توسط گیاه

Table 2- Amount of herbicide translocated to different organs of susceptible and resistant Phalaris minor Retz. (percentage of herbicide absorbed by plant)

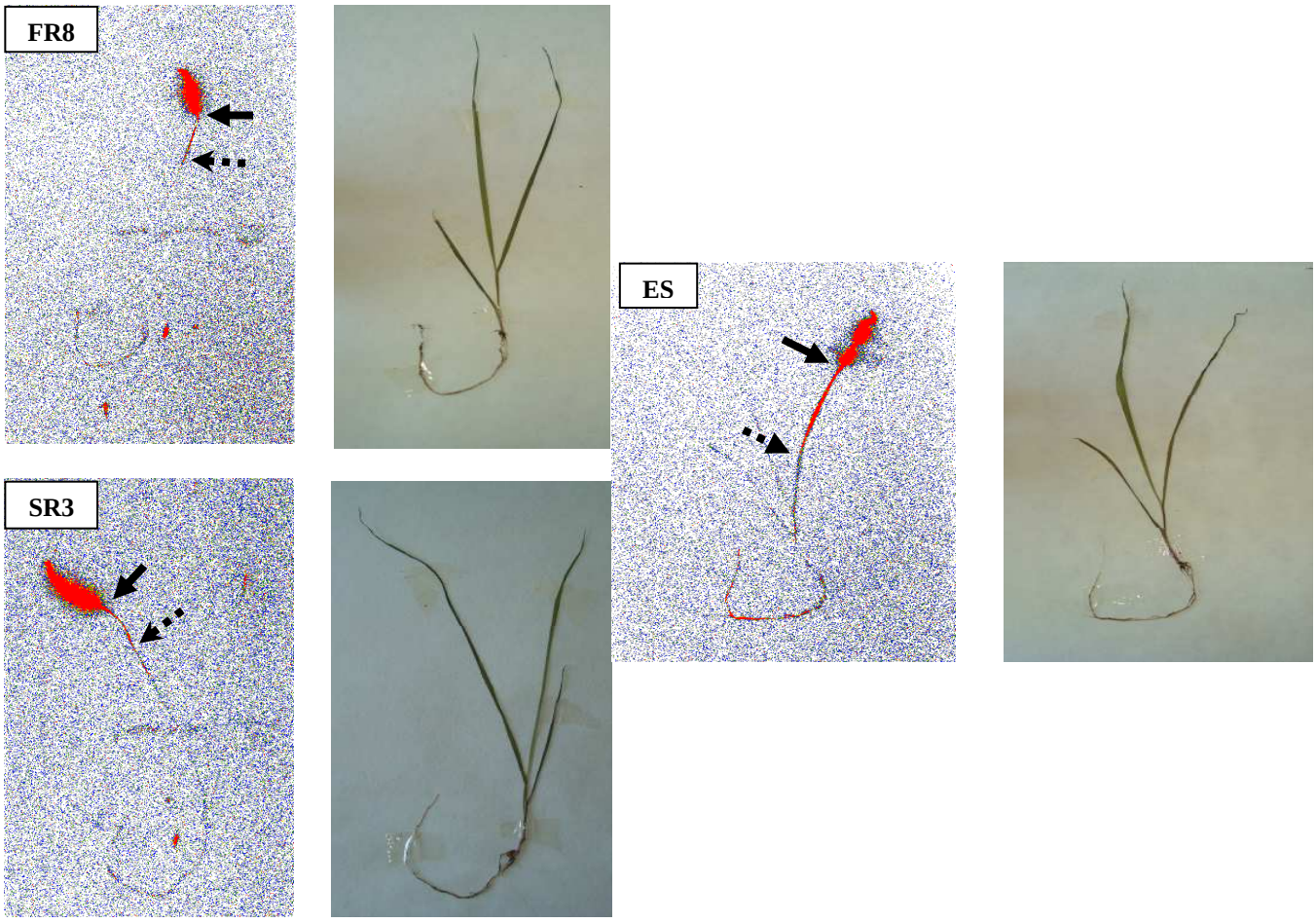
Biotype / Organ	SR3	FR8	ES
Treated leaf	98.42 ± 0.34	98.23 ± 0.61	98.19 ± 0.46
Rest of Plant	0.96 ± 0.38	0.74 ± 0.30	0.96 ± 0.47
Root	0.62 ± 0.29	0.78 ± 0.21	0.60 ± 0.29

بررسی کیفی انتقال علف‌کش: عکس‌های رادیوگرافی بدست آمده توسط دستگاه سایکلون در روز نهم پس از اعمال علف‌کش نشاندار دایکلوفوپ، بیانگر آن بود که میزان انتقال علف‌کش در بیوتیپ‌های حساس و مقاوم (SR3 و FR8)

یکسان بوده و مقدار بسیار کمی از علف‌کش دایکلوفوپ به برگ‌های تیمار نشده و ریشه منتقل شده بود (شکل‌های ۲ و ۳).

کاهش میزان جذب و یا انتقال علف‌کش در پیکره گیاه، به عنوان یکی از مکانیسم های بالقوه برای مقاومت باریک‌برگ‌ها به بازدارنده‌های ACCase عنوان شده است (Devine, 1997). Bradley *et al*., (2001) در آزمایشی برای بررسی مکانیسم های مقاومت *Sorghum halepense* (L.) Pers. به علف‌کش‌های APP، میزان جذب و انتقال علف‌کش کوئیزالوفوپ اتیل در این علف هرز مقاوم را مورد مطالعه قرار دادند. این محققین گزارش کردند که میزان جذب علف‌کش در بیوتیپ مقاوم بطور معنی‌داری بیشتر از بیوتیپ حساس بود بطوری‌که بعد از گذشت ۸ ساعت میزان جذب در بیوتیپ مقاوم ٤٥ ٪ و در بیوتیپ حساس ۳۰ ٪ از میزان تیمار شده بود. پس از گذشت ۷۲ ساعت، میزان علف‌کش جذب شده در هر دو بیوتیپ یکسان شد. بنابراین بنظر ایشان، میزان جذب نمی‌تواند به عنوان مکانیسم مقاومت به علف‌کش کوئیزالوفوپ اتیل در این گیاه مطرح باشد. در این آزمایش تفاوتی از نظر میزان انتقال علف‌کش از برگ به ریشه و سایر اندامهای هوایی، در زمان-های اندازه‌گیری پس از تیمار علف‌کشی، بین بیوتیپ حساس و مقاوم ملاحظه نشد و تقریباً عمده علف‌کش اعمال شده در همان برگ تیمار شده باقی مانده بود. (*De Prado et al., 2004*) نیز گزارش کردند که میزان جذب علف‌کش دایکلوفوپ پس از ٤٨ ساعت در بیوتیپ مقاوم *Setaria viridis* (L.) Beauv. ، ۳۰/۲۹ درصد و در بیوتیپ حساس آن ۲٤/۳ بود، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. از طرفی میزان انتقال علف‌کش یاد شده نیز هر دو بیوتیپ یکسان بوده و بنابراین تغییر در جذب و انتقال علف‌کش نمی‌تواند به عنوان مکانیسم مقاومت در بیوتیپ مقاوم مطرح باشد.

نتایج این آزمایش نیز نشان داد که جذب و انتقال علف‌کش نقش موثری در ایجاد مقاومت در بیوتیپ‌های مورد بررسی فالاریس نداشته است که این نتیجه با نتایج سایر محققین تطابق دارد. تجزیه کیفی و بررسی عکس‌های رادیوگرافی نشان می‌دهد که میزان انتقال علف‌کش تیمار شده از محل اعمال قطرکها (نوک پیکان توپر در شکل ۲) به سمت نوک برگ (مسیر سیمپلاست) در همه بیوتیپ‌ها بطور یکسان و کامل انجام شده در حالیکه میزان انتقال به سمت قاعده برگ در بیوتیپ حساس ES بیشتر از دو بیوتیپ مقاوم می‌باشد (نوک پیکان نقطه چین شکل ۲). در واقع شعاع پوشش قطرک سم در پیکره گیاه حساس بیشتر از بیوتیپ‌های مقاوم بوده و ممکن است دلیلی بر مقاومت بیوتیپ FR8 و SR3 باشد. البته این مورد نیاز به آنالیزکمی و بررسی بیشتر درباره مقدار تاثیر آن بر مقاومت یا حساسیت بیوتیپ‌ها دارد.



شکل ۲- عکس رادیو گرافی از پیکره گیاهچه بیوتیپ حساس و بیوتیپ‌های FR8 و SR3 فالاریس، ۹ روز پس از تیمار با علف‌کش دایکلوفوپ نشاندار

Figure 2– X-ray images of ES, FR8 and SR3 seedlings 9 days after treatment with ^{14}C-labeled diclofop herbicide

متابولیسم

نتایج آنالیز داده های مربوط به این آزمایش نشان داد که در هر سه بیوتیپ مورد بررسی، رشد گیاهچه‌های فالاریس تحت تأثیر علف‌کش دایکلوفوپ قرار گرفته‌اند (جدول ۳). افزودن ABT و PBO به علف‌کش نیز تأثیر معنی‌داری بر روی رشد گیاهچه‌های فالاریس اعمال نکرد. بدین معنا که آنزیم سیتوکروم P450 نقشی در متابولیسم علف‌کش دایکلوفوپ در پیکره این گیاهچه‌ها نداشته و یا میزان فعالیت آن قابل توجه نمی‌باشد. اگر این آنزیم در متابولیسم علف‌کش‌ها در بیوتیپ‌های مورد آزمایش نقش مؤثری ایفا می‌کرد، می بایستی با افزودن ABT و PBO (که از فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 ممانعت به عمل می‌آورند)، حساسیت بیوتیپ‌های یاد شده به علف‌کش تیمار شده افزایش یافته و در نتیجه کاهش رشد قابل ملاحظه‌ای در رشد گیاهچه آنها رخ می داد. برخی از محققین از متابولیسم علف‌کش‌ها به عنوان عامل بروز مقاومت در برخی گونه‌های هرز اشاره کرده‌اند. افزایش متابولیسم به عنوان مکانیسم مقاومتی به بازدارنده‌های APP و CHD در *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (Hidayat & Preston, 1997; Volenberg & Stoltenberg, 2002)، *A. myosuroides* Huds. گزارش شده (Hall *et al*., 1997; Mennedez & De Prado, 1996) است. مطالعات بعدی نشان داد که افزایش سطح آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز مسئول بروز مقاومت در این بیوتیپ ها به علف‌کش فنوکساپروپ می‌باشد (Cummins *et al*. 1997). همچنین افزایش متابولیسم علف‌کش به عنوان عاملی برای

مقاومت برخی بیوتیپ های یولاف وحشی (Maneechote *et al*., 1994) و *L. rigidum* Gaud. (Holtum *et al*., 1991) مطرح شده است. Letouze & Gasquez (2001) نیز وجود همزمان دو مکانیسم یعنی آنزیم ACCase تغییر یافته و متابولیسم را عامل مقاومت *A. myosuroides* Huds. به فنوکساپروپ – پی اتیل اعلام کرده‌اند. با وجود این برخی دیگر از محققین مانند De Prado *et al*. (2000) و *Marles et al., (1993)* بترتیب در بررسی مکانیسم مقاومت *L. multiflorum* Lam. و *S. viridis* (L.) Beauv. به بازدارنده‌های ACCase پی بردند که بیوتیپ های حساس و مقاوم به یک نسبت علف‌کش را متابولیزه می‌کنند و از این حیث تفاوتی بین آنها مشاهده نکردند.

طبق نتایج این آزمایش، حداقل در بیوتیپ‌های مقاوم مورد آزمایش فالاریس، سیتوکروم P450، نقش کلیدی در مقاومت به دایکلوفوپ و احتمالاً سایر فوپ ها ایفا نمی‌کند. البته مجموعه‌ای از پروتئین ها در قالب سیتوکروم در پیکره گیاهان و جانوران برای متابولیسم مواد سمی و زائد، فعالیت می‌کنند (Bernhardt, 2006) که ممکن است ABT و PBO صرفاً از فعالیت تعدادی از آنها (و نه همه) جلوگیری کند. از طرفی گلوتاتیون – s– ترانسفراز نیز در متابولیسم علف‌کش‌ها در پیکره گیاهان موثر است (Reade *et al*., 2004) که در این آزمایش مورد بررسی قرار نگرفته و می‌تواند به عنوان عاملی مهم در این رابطه مطرح باشد.

جدول ۳- آنالیز داده‌های مربوط به آزمایش بررسی متابولیسم دایکلوفوپ متیل در دو بیوتیپ مقاوم SR3 و FR8 و بیوتیپ حساس ES

Table 3- Analysis of variance for metabolism of diclofop methyl in two resistant (FR8 and SR3) and susceptible (ES) biotypes

		MS		
S.O.V	**df**	**ES**	**FR8**	**SR3**
Herbicide	1	1148.1 **	1743.45**	267.49 **
Cytochrome inhibitor	2	25.87 ns	21.50 ns	1.34 ns
Cytochrome inhibitor* Herbicide	2	13.7 ns	15.44 ns	8.84 ns

**: significant at %1, ns: not significant at %5.

منابع

Bernhardt, R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. J. Biotechnol. 124:128–145.

Bradley, K.W., Wu, J., Hatzios, K. K. and Hagood, E.S. 2001. The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedion herbicides in a johnsongrass biotype. Weed Sci. 49: 477- 484.

Cummins, I., Moss, S., Cole, D.J. and Edwards, R. 1997. Glutathione transferase in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). Pest. Sci. 51:244-250.

De Ruiter, H., Uffing, A. J. M., Meinen, E. and Prins, A. 1990. Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions. Weed Sci. 38:567–572.

De Prado, R., Gonza'lez-Gutierrez, J., Menendez, J., Gasquez, J., Gronwald, J. W. and Gimenez-Espinosa, R. 2000. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. Weed Sci. 48: 311-318.

De Prado, R., Osuna, M. D. and Fischer, A.J. *2004. Resistance* to ACCase inhibitor herbicides in a green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe. Weed Sci. 52: 506-512.

Devine, M. D. 1997. Mechanisms of resistance to acetyl coenzyme A carboxylase: A review. Pest. Sci. 51: 259–264.

Gherekhloo, J. 2008. Tracing resistant *Phalaris minor* populations and studying their resistance mechanisms to aryloxyphenoxy propionate herbicides in Fars and Golestan wheat fields. Ph.D. thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English Summary).

Gherekhloo, J., Rashed Mohassel, M. H., Nassiri Mohallati, M., Zand, E., Ghanbari, A. and De Prado, R. 2008. Greenhouse assay to investigate

resistance of littleseed canary grass (*Phalaris minor*) to aryloxyphenoxy propionate herbicides. Iranian J. of Field Crop Res. 6(2): 353-361. (In Persian with English Summary).

Gherekhloo, J., Rashed Mohassel, M. H., Nassiri Mahallati, M., Zand, E., Ghanbari, A., Osuna M.D. and De Prado, R. 2011. Confirmed resistance to aryloxyphenoxy propionate herbicides in *Phalaris minor* populations from Iran. Weed Biol Manag. 11: 29–37.

Gherekhloo, J. and Zand, E. 2010. A short review on conducted herbicide-resistance researches in Iran. 11th Iranian Crop Science Congress. 24-26 July. Tehran. (In Persian with English Summary).

Gronwald, J. W., Eberlein, C. V., Betts, K. J., Baerg, R. J., Ehlke, N. J. and Wyse, D. L. *1992*. Mechanism of diclofop resistance in an Italian ryegrass (*Lolium multiflorum Lam.) biotype.* Pest Biochem Physiol. *44:126-132.*

Hall, L. M., Moss, S. R. and Powles, S. B. 1997. Mechanisms of resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two resistant biotypes of *Alopecurus myosuroides* (blackgrass): herbicide metabolism as a cross-resistance mechanism. Pest Biochem Physiol. 57: 87-98.

Hausler, R. E., Holtum, J. A. M. and Powles, S. B. 1991. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). IV. Correlation between membrane effects and resistance to graminicides. Plant Physiol. 97:1035-1043.

Heap, I. M. 2011. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: http://www.weedscience.org/summary/MOASummary.asp. Accessed 19/Feb/2011.

Hidayat, I. and Preston, C. 1997. Enhanced metabolism of fluazifop acid in a biotype of *Digitaria sanguinalis* resistant to the herbicide fluazifop-P-butyl. Pestic Biochem Physiol. 57: 137-146

Holtum, J. A. M., Matthews, J. M., Liljegren, D. R. and Powles, S.B. 1991. Cross resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). III. On the mechanism of resistance to diclofop-methyl. Plant Physiol. 97: 1026–1034

Letouze, A. and Gasquez, J. 1999. A rapid reliable test for screening aryloxyphenoxypropionic acid resistance within *Alopecurus myosuroides* and *Lolium* spp. populations. Weed Res. 39: 37-48.

Letouze, A. and Gasquez, J. 2001. Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. Theor Appl Genet. 103:288–296.

Maneechote, C., Holtum, J. A. M., Preston, C. and Powles, S. B. *1994.* Resistant acetyl-CoA carboxylase is a mechanism of herbicide resistance in a biotype of *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana*. *Plant Cell Physiol*. 35: 627-635.

Maneechote, C., Samanwong, S. and Zhang, X. 2005. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensi*). Weed Sci. 53: 290-295.

Marles, M. A. S., Devine, M. D. and Hall, J. C. *1993.* Herbicide *resistance* in *Setaria viridis* conferred by a less sensitive form of acetyl- coenzyme A carboxylase. Pestic Biochem Physiol. 46:7-13.

Menendez, J. and De Prado, R. 1996. Diclofop-methyl cross resistance in a chlotoluron resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. Pestic Biochem Physiol. 56:123-133.

Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, J.P. and Gauvrit, C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. Weed Sci. 55:435–440.

Price, L. J., Herbert, D., Cole, D. J. and Harwood, J. L. 2003. Use of plant cell cultures to study graminicide effects on lipid metabolism. Phytochemistry. 63: 533-541.

Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J. and Mallory-Smith, C. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum.* Planta. 226: 395-404.

Reade, J. P. H., Milner, L.J. and Cobb, A.H. 2004. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. Weed Sci. 52:468–474.

Richardson, R. G. 1984. Fluorescent tracer technique for measuring total herbicide deposits on plants. Australian Weeds. 3:123–124.

Sasaki, Y. and Nagano, Y. 2004. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. Biosci Biotechnol Biochem. 68:1175-1184.

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.

Volenberg, D. and Stoltenberg, D. 2002. Altered acetyl-coenzyme a confers resistance to clethodim, fluazifop and sethoxydim in *Setaria faberi* and *Digitaria sanguinalis*. Weed Res. 42:342–350.

Study the Non-Target Site Based Mechanisms of Resistance in Aryloxyphenoxy Propionate Resistant-*Phalaris Minor* Retz. Biotypes

Javid Gherekhloo [1], Mohammad Hassan Rashed Mohassel [2], Mehdi Nasiri Mahalati [2], Eskandar Zand [3], Ali Ghanbari [2], Rafael De Prado [5]

Department of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Science and Natural resources ,2-Department of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad, Iran 3-Weed Research Department, Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran, 3-Department of Agricultural Chemistry, University of Córdoba, Spain.

Abstract

Acetyl co-enzyme A carboxylase inhibitors are commonly used for post emergence control of grass weeds in broad leaf crops. Some of these herbicides are applied to control grass weeds in wheat and barley fields. Recently some aryloxyphenoxy propionate-resistant *Phalaris minor* Retz. populations that have developed the resistance to diclofop methyl, fenoxaprop-P butyl and clodinafop propargyl, have been detected in wheat fields of Fars where these graminicides had been applied for several years. Previous biochemical studies revealed that mechanism of resistance in SR3, MR4 and AR biotypes is due to presence of an herbicide-resistant ACCase enzyme in the biotypes. There was not significant difference between susceptibility of ACCase enzyme of other resistant biotypes (FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR8, MR1, MR2, ER1, ER2 and GR2-1) and susceptible one (ES). In order to study the non-target site based mechanism(s) of resistance to diclofop methyl in two resistant *Phalaris minor* Retz. biotypes, some experiments were conducted to investigate retention, absorption, translocation and metabolism of diclofop methyl in the resistant (SR3 and FR8) and susceptible (ES) biotypes in Agro – Biochemistry Laboratory of Córdoba University, Spain, during 2008. The amount of herbicide retention and absorption did not differ among resistant and susceptible biotypes. Almost all of the absorbed herbicide remained in the treated leaf and only a little bit of diclofop methyl was translocated to other parts of the treated plants in both resistant and susceptible biotypes. The results of this study showed that there was not difference in retention, absorption, translocation and metabolism of diclofop methyl between FR8 and susceptible one; suggesting unknown mechanism of resistance may be involved in FR8 plants.

Key words: Absorption, metabolism, retention and translocation