مجله دانش علف‌های‌هرز

مجله دانش علف‌های‌هرز (۱) ٦ (۱۳۸۹) ۵۲- ۳۳

مقایسه روش مولکولی dCAPS با روش‌های رایج برای تشخیص مقاومت علف هرز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu.) نسبت به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل

اسکندر زند*[۱] ، آرش رزمی[۲]، فاطمه بناء کاشانی[۲]، فهیمه نظری[۲]، جاوید قرخلو[۳]

عضو هیات علمی بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی۲- عضو هیئت علمی بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی۳- عضو هیات علمی دانشگاه کشاورزی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۰

چکیده

به منظور مقایسه روش ملکولی با روش های رایج برای تشخیص علف هرز یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل، ۱۷ توده مشکوک به مقاومت و یک توده حساس از طریق چهار روش غربال گیاه کامل در گلخانه، زیست سنجی گیاه کامل در گلخانه، زیست سنجی گیاهچه در پتری و روش مولکولی dCAPS مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده بین آزمایش غربال گیاه کامل در گلخانه، زیست سنجی گیاه کامل در گلخانه و زیست سنجی گیاهچه در پتری همخوانی کامل برقرار بود. البته درجه مقاومت محاسبه شده توده‌ها در روش زیست‌سنجی بذر به دلیل تفاوت شرایط آزمایش، پایین‌تر از روش زیست سنجی گیاه کامل در شرایط گلخانه‌ای بود. آزمایش‌های مولکولی برای تشخیص موتاسیون در موقعیت ۱۷۸۱ (Ile1781Leu) و ۲۰۴۱ (Ile2041Asn) آنزیم استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز نیز حاکی از آن بود که از بین ۱۷ توده یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش، علت مقاومت ۸ توده (۴۴ درصد از توده های مورد مطالعه) جهش در موقعیت ۱۷۸۱ بود و در هیچ یک از توده‌ها جهش در موقعیت ۲۰۴۱ مشاهده نشد. در مجموع به نظر می‌رسد در بیوتیپ‌هایی که در آزمایش از طریق روش‌های رایج مقاوم، ولی در آزمایش ملکولی حساس تشخیص داده شدند، جهش در نقطه دیگری اتفاق افتاده است و یا مکانیزم مقاومت آنها مبتنی بر متابولیسم است.

واژه‌های کلیدی: علف‌های هرز باریک برگ، بازدارنده‌های ACCase، سنجش گیاه کامل، زیست‌سنجی بذر.

*Corresponding author. E-mail: eszand@yahoo.com

مقدمه

استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (ACCase, EC 6.4.1.2) یک آنزیم حاوی بیوتین است که کربوکسیلاسیون وابسته به ATP استیل کوآنزیم آ به مالونیل کوآنزیم آ را، طی یک واکنش دو مرحله‌ای برگشت‌پذیر در اولین مرحله سنتز اسیدهای چرب کاتالیز می‌کند (Delye, 2005). علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز گروهی از علف‌کش‌های پس‌رویشی، بسیار کارآمد و با اهمیت از نظر اقتصادی هستند که به عنوان باریک برگ‌کش انتخابی در مزارع گندم ایران مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zand *et al*., 2010). این علف‌کش‌ها دارای سه خانواده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات، سیکلوهگزانیدون و فنیل پیرازولین هستند (Zand *et al*., 2010). علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل از جمله پرمصرف‌ترین علف‌کش‌های بازدارنده ACCase است که برای مبارزه با علف‌های هرز باریک برگ بخصوص یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu.) در مزارع گندم ایران مورد استفاده قرار می‌گیرید (Deihimfard *et al*., 2007). کاربرد متوالی این علف‌کش‌ها در مزارع گندم ایران منجر به ظهور بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی، چچم و فالاریس نسبت به این علف‌کش شده است (Gherekhlo & Zand, 2010). روش تشخیص مطمئن و سریع بیوتیپ‌های مقاوم از جمله مواردی است که به مدیریت صحیح علف‌های هرز مقاوم کمک می‌کند (Beckie *et al*., 2000).

برای تشخیص مقاومت علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش و از جمله علف هرز یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase، روش‌های مختلفی وجود دارد که برخی از این روش‌ها رایج بوده و عبارتند از: غربالگری گیاه کامل حاصل از بذر با استفاده از دز توصیه شده در گلخانه، زیست سنجی گیاه کامل حاصل از بذر در گلخانه، غربالگری گیاهچه حاصل از بذر با استفاده از دز تشخیص دهنده در گلخانه، زیست سنجی گیاهچه حاصل از بذر در پتری، غربالگری گیاه کامل حاصل از تکثیر پنجه‌ها با استفاده از دز توصیه شده در گلخانه و زیست سنجی گیاه کامل حاصل از تکثیر پنجه‌ها در گلخانه. روش‌های فوق علی‌رغم برخورداری از دقت بالا، مستلزم وجود فضای وسیع برای انجام آزمایش‌ها و صرف وقت زیاد بوده و در ضمن قادر به تشخیص مکانیزم مقاومت نیستند (Corbett & Tardif, 2006; Kaundun & Windass, 2006; Delye, 2005).

تحقیقات زیادی وجود دارد که در آنها از روش‌های مبتنی بر DNA، مانند CAPS[1] (Konieczny & Ausubel, 1993) و dCAPS[2] (Neff *et al*., 1998) برای تشخیص بیوتیپ‌های مقاوم به علف‌کش و همچنین تشخیص مکانیزم‌های مقاومت به علف‌کش استفاده شده است. در تکنیک CAPS، ابتدا قطعه مورد نظر DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شده و سپس محصول آن تحت تاثیر آنزیم‌های برشی قرار می‌گیرد. این تکنیک قادر به شناسایی تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی و یا SNP[3] هایی است که در محل شناسایی آنزیم‌های برشی رخ داده‌اند و باعث حذف یک مکان برشی یا ایجاد مکان برشی جدیدی می‌شوند. از محدودیت های این روش می‌توان به عدم شناسایی جهش‌های که در خارج از سایت برشی اتفاق می‌افتند اشاره کرد. برای حل این مشکل از روش dCAPS استفاده می شود. در روش dCAPS با استفاده از پرایمرهای که در آنها یک یا چند نوکلئوتید جهش یافته نسبت به DNA الگو طراحی شده است، یک جایگاه برشی (حاوی SNP) در محصول PCR ایجاد می‌شود. سپس محصول PCR تحت تاثیر آنزیم‌های برشی قرار می‌گیرد و حضور یا عدم حضور SNP ها مورد بررسی قرار می‌گیرد (Konieczny & Ausubel, 1993; Neff *et al*., 1998).

[1] Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
[2] derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
[3] Single Nucleotide Polymorphisms

کاندان و ویرداس (Kaundun & Windass, 2006) از روش dCAPS برای تشخیص محل اصلی جهش بوجود آمده در علف‌های هرز باریک برگ نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase استفاده نمودند. آنها معتقدند که روش مذکور یک روش ساده، اقتصادی و قابل استفاده برای گونه‌های مختلف است که به راحتی قادر است توده‌های هموزایگوت حساس (Ile/Ile1781)، هموزیگوت مقاوم (Leu/Leu1781)، و هتروزیگوت مقاوم (Ile/Leu1781) را تشخیص دهد. در تحقیق مذکور از پرایمرهای NsiI1781f/NsiI1781r جهت تکثیر قطعه ۱۶۵ جفت بازی استفاده شد و پس از هضم آنزیمی محصول PCR، (توسط آنزیم *Nsi* I) گیاهان هموزیگوت حساس باند ۱۳۰ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت مقاوم باند هضم نشده ۱۶۵ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت نیز هر دو باند فوق را نشان دادند .

در آزمایش دیگری جهت مشخص نمودن جاگزینی Asn به‌جای Ile در موقعیت ۲۰۴۱ از روش CAPS با پرایمرهای ACCF1/ACCR1 استفاده شد و پس از هضم آنزیمی (توسط آنزیم *Eco*RI) گیاهان هموزیگوت مقاوم (Asn/Asn2041) باند هضم نشده ۴۹۲ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت حساس (Ile/Ile2041) دو باند ۲۰۸، و ۲۸۲ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت (Ile/Asn2041) نیز هر سه باند فوق را نشان دادند (Yu *et al*., 2007).

در این تحقیق کارایی روش‌های مولکولی برای تشخیص مقاومت علف هرز 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 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

مواد گیاهی

در این آزمایش ۱۷ توده مشکوک به مقاومت که از منطقه سرپل ذهاب کرمانشاه جمع آوری شده بود نسبت به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل در مقایسه با یک توده حساس نسبت به این علف‌کش مورد مطالعه قرار گرفتند. شیوه جمع آوری توده های مشکوک و حساس به شرح زیر بود.

جمع‌آوری بذور حساس: با توجه به اینکه در مطالعات مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها، جمعیت‌های حساس در حضور جمعیت‌های مقاوم و در مقایسه با آنها سنجیده می‌شوند (Beckie *et al*., 2000). در این تحقیق نیز بذور علف هرز حساس به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل از مناطقی از سرپل ذهاب که سابقه مصرف علف‌کش مورد نظر در آنجا وجود نداشت، جمع آوری شدند.

جمع‌آوری بذور مشکوک به مقاومت: بدین منظور مزارعی برای نمونه‌گیری انتخاب شدند که حداقل ۵ سال سابقه مصرف علف‌کش کلودینافوپ پروپاژیل را داشته و کشاورزان این مزارع از کارآیی علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل در کنترل علف هرز یولاف وحشی ناراضی بودند (De Prado *et al*., 2000) از هر مزرعه حدود ۵۰۰ گرم بذر خالص جمع‌آوری و پس از خشک شدن بذور، نمونه‌ها کدگذاری و آماده آزمایش شدند.

روش انجام هر آزمایش

در این تحقیق از چهار روش غربال گیاه کامل در گلخانه، زیست سنجی گیاه کامل در گلخانه، زیست سنجی گیاهچه در پتری و روش مولکولی استفاده شد که هر یک از روش‌ها به تفصیل در ادامه توضیح داده خواهد شد

آزمایش غربال گیاه کامل در گلخانه

قبل از انجام آزمایش و به منظور یکنواختی در سبز شدن گیاهچه‌ها، ابتدا بذور در ژرمیناتور جوانه‌دار شده، سپس از هر توده تعداد ۱۰ بذر جوانه‌دار به گلدان‌هایی به قطر ۱۲ سانتی‌متر و حجم ۵۰۰ سانتی‌متر مکعب که حاوی نسبت‌های مساوی رس، شن و کود دامی بودند، منتقل و در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک کشت شد. سپس گلدان‌های کشت شده با

شرایط ١٦ ساعت روشنایی با ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با ۱۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه قرار داده شدند و آبیاری گلدان‌ها نیز روزانه به میزان لازم بر اساس مشاهده رطوبت سطح خاک صورت گرفت (Zand & Beckie, 2002). هر گلدان به منزله یک تکرار بوده و آزمایش با سه تکرار برای هر توده انجام شد. برای هر تکرار نیز یک گلدان به عنوان شاهد سم‌پاشی نشده در نظر گرفته شد تا داده‌های حاصل برحسب در صد نسبت به شاهد سم‌پاشی نشده مورد ارزیابی قرار گیرد.

در مرحله ۲ تا ۳ برگی یولاف وحشی (۳ تا ٤ هفته بعد از کاشت)، گیاهچه‌ها با دستگاه سم‌پاش ثابت نازل متحرک و توسط نازل بادبزنی یکنواخت با دز توصیه شده به میزان ۰/۸ لیتر در هکتار از ماده تجاری، معادل ٦٤ گرم ماده موثره در هکتار مورد سم‌پاشی قرار گرفتند. قبل از سم‌پاشی و۳۰ روز پس از سم‌پاشی تعداد گیاهان زنده باقی مانده در هر گلدان یاداشت شد و به صورت درصد گیاهان باقیمانده در ۳۰ روز پس از سم‌پاشی نسبت به قبل از سم‌پاشی محاسبه شد. بعد از ثبت تعداد گیاهان زنده داخل هر گلدان، بوته‌ها از سطح خاک برداشت شده و به مدت ٤۸ ساعت در آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توسط ترازوی حساس با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند. بر اساس تعداد بوته‌های داخل هر گلدان و وزن خشک کل اندام هوایی بوته‌های داخل هر گلدان، میانگین وزن خشک اندام هوایی تک بوته برای هر توده بدست آمد. سپس درصد وزن خشک تک بوته هر توده تیمار شده با علف‌کش نسبت به شاهد صفرخودش (شاهد بدون مصرف علف‌کش از همان توده) بدست آمد. ضمناً جهت ارزیابی چشمی خسارت از شاخص EWRC[1] (Sandral *et al*., 1997) استفاده شد. ازآنجا که در آزمایش‌های غربال، استفاده از آزمون‌های آماری مقایسه میانگین اهمیت چندانی ندارد (Beckie *et al.,* 2000)، در این آزمایش مقایسه میانگین انجام نشد ولی توده‌ای به عنوان توده مقاوم در نظر گرفته شد که حداقل ۸۰٪ تعداد و ۵۰٪ وزن خشک خود را نسبت به شاهد بدون سم‌پاشی حفظ کرده و میزان کنترل آن بر اساس شاخص EWRC حداکثر ٤۰٪ (نمره ۸+۹) بود.

زیست سنجی گیاه کامل در گلخانه

به منظور بدست آوردن درجه مقاومت توده‌هایی که در آزمایش غربال اولیه، در برابر دز توصیه شده علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل مقاومت نشان دادند، آزمایش زیست سنجی (واکنش به دز) گیاه کامل برای هر توده به صورت جداگانه ولی همزمان به صورت طرح بلوک کامل تصادفی در ٤ تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش برای هر توده شامل هفت دز از علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل (۰، ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲ برابر دز توصیه شده) بود. بر این اساس مقدار ماده مؤثره بکار رفته برای این دزها عبارت بود از: ۰، ٦٤، ۱۲۸، ۲۵٦، ۵۱۲، ۱۰۲٤، ۲۰٤۸ گرم ماده مؤثره در هکتار. در این آزمایش بوته‌های یولاف وحشی در مرحله ۲ تا ۳ برگی (حدود ۳ تا ٤ هفته بعد از کاشت) توسط دستگاه سم‌پاش با نازل پاشش یکنواخت متحرک، سم‌پاشی شدند. کلیه مراحل داشت و شرایط گلخانه‌ای مشابه آزمایش غربال اولیه بود. چهارهفته بعد از سم‌پاشی، درصد تعدادگیاهان زنده باقی مانده نسبت به قبل از سم‌پاشی و درصد وزن تر و وزن خشک تک بوته هر توده تیمار شده با علف‌کش نسبت به شاهد خودش محاسبه شد. ضمناً جهت ارزیابی چشمی خسارت از شاخص EWRC (Sandral *et al*., 1997) استفاده شد.

برای بدست آوردن منحنی‌های واکنش به دز توده‌های مقاوم و توده حساس به علف‌کش مورد آزمایش، معادله لجستیک زیر (معادله ۱) توسط نرم افزار Sigma plot به داده‌های مورد نظر برازش داده شد (Streibig, 1998).

$$Y= C+(D-C)/1+(x/ED50)b \qquad (۱)$$

که در این معادله: Y: متغیر وابسته (درصد تعدادگیاهان زنده باقی‌مانده نسبت به قبل از سم‌پاشی، درصد وزن تر و یا وزن خشک تک بوته هر توده تیمار شده با علف‌کش نسبت به

[1] European Weed Research Council

شاهد)، x: غلظت علف‌کش، C: پایین‌ترین حد منحنی، D: بالاترین حد منحنی، b: شیب منحنی در نقطه ED_{50} و ED_{50}: دزی از علف‌کش که باعث کاهش ۵۰٪ در پاسخ می‌شود. در حالتی که در معادله فوق مقدار متغیر C صفر بوده و یا از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با صفر نداشت، از معادله ۲ استفاده شد (Ritz & Streibig, 2005).

$$Y= D/1+(x/ED50)b \qquad (۲)$$

درجه مقاومت توده‌های مقاوم به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل از نسبت ED_{50} توده مقاوم (R) بر ED_{50} توده حساس (S) بدست آمد. این شاخص تحت عنوان نسبت R/S توسط محققان مورد استفاده قرار گرفته است (De Prado *et al.*, 2000).

آزمایش زیست سنجی گیاهچه در پتری

دز تفکیک کننده غلظتی از سم مورد نظر می‌باشد که بیشترین اختلاف عمودی را بین منحنی‌های دز-پاسخ مربوط به توده‌های مقاوم و حساس ایجاد کند و حداقل باعث ۸۰ درصد بازدارندگی رشد در توده حساس شود (Beckie *et al.*, 2000). در این آزمایش دز تفکیک کننده برای علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل براساس مجموعه آزمایش های قبلی، برابر ۰/۰۸۵ قسمت در میلیون در نظر گرفته شد (Gherekhlo & Zand, 2010). به منظور تعیین درجه مقاومت، توده‌های مختلف یولاف وحشی با دز صفر و چندین دز بالاتر از دز تفکیک کننده (۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲ و ٦٤ برابر دز تفکیک کننده، برابر ۰/۰۸۵، ۰/۱۷، ۰/۳٤، ۰/٦۸، ۱/۳٤، ۲/٦۸ و ۵/۳٦ قسمت در میلیون) مورد زیست‌سنجی در پتری‌دیش قرار گرفتند. بدین منظور آزمایش جداگانه ای در چهار تکرار انجام گرفت. طول کلئوپتیل در هفت روز بعد از اعمال تیمار علف‌کش تعیین و به صورت درصد از شاهد برای هر توده محاسبه گردید.

روش مولکولی

این روش متشکل از مجموعه مراحل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برش آنزیمی بود که به اختصار هر یک از مراحل در ادامه توضیح داده خواهد شد.

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA از برگ گیاه کامل از روش CTAB[1] (Cullings, 1992) استفاده شد. حدود ۰/۲ گرم از نمونه برگی در هاون چینی ریخته و با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر یکنواخت تبدیل گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج CTAB (2% CTAB (w/v), 100 mM Tris HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) Mr 40,000)) در داخل میکروتیوب‌های حاوی پودر گیاه ریخته و تیوب‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس۵۰۰ میکرولیتر ازمحلول ۱:۲٤ (کلروفرم : ایزوآمیل الکل) به تیوب‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شد. محلول فوق با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و سوسپانسیون بالایی به تیوب‌های جدید منتقل گردید. معادل ۰/۱حجم مایع داخل تیوب‌های جدید، استات آمونیوم ۷/۵ مولار سرد و بلافاصله ۰/۵ برابر آن ایزوپروپانل سرد اضافه شد و تیوب‌ها به مدت یک شب در فریزر نگهداری گردید تا DNA به خوبی ته‌نشین شود. سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نموده و فاز فوقانی را با احتیاط بیرون ریخته و رسوب DNA را با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و DNA خشک شده در فضای اتاق در ۸۰ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 1 mM EDTA) حل گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: واکنش PCR با کمک ترمال سایکلر Bio Rad در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی ۰/۲ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها (جدول ۱)، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از dNTPها همچنین ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR buffer، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم

[1]- Cethyl three methyl aminium bromide

از DNA ژنومی و ۰/۲۵ میکرولیتر از DNA پلیمراز Taq ۵ یونیت بود. برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ 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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش رشته جدید 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.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده

Table 2.Primers used

Primer	Sequence 5′-3′	Reference
ACCF1	CACAGACCATGATGCAGCTC	Yu *et al*., 2007
ACCR1	CTCCCTGGAGTTGTGCTTTC	–
NsiI1781f	CTGTCTGAAGAAGACTATGGCCG	Kaundun & Windass, 2006
NsiI1781r	AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGCA	–

برش آنزیمی قطعه تکثیر شده: به منظور تشخیص توده‌های مقاوم و حساس، واکنش هضم آنزیمی در حجم نهایی ۳۲ میکرولیتر طبق توصیه شرکت سازنده(فرمنتاز) و با مقادیر ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x و ۲ میکرولیتر آنزیم برش (جدول ۲) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ٦ 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(0.5x مورد الکتروفورز قرار گرفت.

جدول ۲- آنزیم های برشی استفاده شده در آزمایش

Table 2. Restriction enzymes used

Enzyme	Commercial Isoschizomers	Reference
***Eco*RI**	FunII	Yu et al. 2007
***Nsi*1**	Mph11031	Yu et al. 2007

نتایج و بحث

آزمایش غربال اولیه: نتایج آزمایش غربال اولیه نشان داد که کلیه توده‌های مشکوک مورد آزمایش بر اساس شاخص‌های مورد نظر به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل مقاوم می‌باشند.

در خصوص توده حساس نیز همانطور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، میزان کنترل بر اساس شاخص EWRC در ۳۰ روز پس از سم‌پاشی ۷۳ درصد؛ تعداد بوته یولاف‌وحشی باقی‌مانده نسبت به قبل از سم‌پاشی، ٦۰ درصد و میزان وزن تر و خشک تک بوته نسبت به شاهد به ترتیب ۲۵ و ۱۰ درصد بود. این اطلاعات حاکی از آن است که علی‌رغم آنکه علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل نتوانسته است تعداد این توده را نسبت به قبل از سم‌پاشی به مقدار قابل توجهی کاهش دهد، ولی وزن خشک و تر آن را به شدت کاهش داده است (شکل ۱).

جدول ۳ . نتایج آزمایش غربال بیوتیپ های یولاف وحشی با علف کش کلودینافوپ پروپاژیل

Table 3. Results of screening test of wild oat biotypes with clodinafop-propargyl

wild oat biotypes	EWRC score (30 day after spraying)	Weed population reduction (% of control)	Weed fresh weight reduction (% of control)	Weed dry weight reduction (% of control)
Z1	18	100	29	66
Z3	15	88	34	68
Z4	25	90	51	44
Z5	13	100	21	74
Z6	25	86	58	35
Z7	20	73	36	58
Z8	15	100	15	79
Z9	10	100	2	93
Z10	10	100	26	76
Z12	13	78	38	50
Z13	15	100	2	95
Z14	15	100	4	98
Z15	13	100	33	74
Z16	13	67	19	86
Z17	10	100	40	66
Z19	13	100	27	81
Z 20	13	100	3	96
Z (s*)	73	60	25	10

* S: Susceptible biotype

چنانچه قضاوت بر اساس آزمایش غربال و منطبق با شاخص ادکینز و همکاران (Adkins *et al*., 1997) صورت گیرد، در این آزمایش بیوتیپ‌های که درصد گیاه زنده مانده آنها بیش از ۵۰ و درصد وزن خشک تک‌بوته بیوتیپ تیمارشده نسبت به شاهد بیشتر از ۸۰ باشد در گروه مقاوم قرار دارند و با ترتیب همه بیوتیپ ها بجز بیوتیپZ(S) مقاوم و یا احتمالا مقاوم هستند. البته بیوتیپ‌های Z4 و Z6 که در صد تعداد یولاف وحشی باقی‌مانده بعد از سم‌پاشی نسبت به قبل از سم‌پاشی آنها بالای ۸٦ است، ولی درصد وزن خشک تک بوته نسبت به شاهد آنها کمتر از ۵۰ است را بر اساس روش ادکینز و همکاران (Adkins *et al*., 1997) مقاوم نیستند، ولی همین یوتیپ‌ها را اگر همانند سایر بیوتیپ‌ها با روش نظر موس و همکاران (Moss *et al*., 2007) مقایسه کنیم، در گروه بیوتیپ‌های مقاوم قرار خواهند گرفت. موس و همکاران (Moss *et al*., 2007) بیوتیپ های که درصد کاهش وزن تر آنها نسبت به شاهد بین صفر تا ۳٦٪ است را در گروه RRR (مقاومت بالا، اثر علف‌کش را کاهش می‌دهند)، بیوتیپ‌های که درصد کاهش وزن تر نسبت به شاهد آنها بین ۳٦٪ تا ۷۲٪ است را در گروه RR (مقاومت بالا، احتمالاً اثر علف‌کش را کاهش می‌دهد)، بیوتیپ‌های که درصد کاهش وزن تر نسبت به شاهد آنها بین ۷۲٪ تا ۸۱٪ است را در گروه R? (مشکوک به مقاومت، احتمالاً اثر علف‌کش را کاهش می‌دهد) و بیوتیپ‌های که درصد کاهش وزن تر نسبت به شاهد آنها بین ۸۱٪ تا ۱۰۰٪ است را درگروه S (حساس) قرار می‌دهند.

مقایسه ضرایب همبستگی شاخص‌های اندازه‌گیری شده در آزمایش غربال اولیه نیز حاکی از آن است که همبستگی بین درصد وزن تر و خشک تک بوته توده‌های مورد مطالعه بسیار بالا بود (۰/۹٤). موس و همکاران (Moss *et al*., 1999; Moss *et al*., 2007) اعتقاد دارند وزن تر نیز می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای غربال اولیه تودهای مقاوم مورد استفاده قرار گیرد. البته همبستگی شاخص چشمی EWRC با درصد وزن تر و وزن خشک تک بوته سمپاشی شده نسبت به شاهد سمپاشی نشده (بین ۰/٦۹ تا ۰/۷۷) بیشتر از همبستگی بین درصد تعداد یولاف‌وحشی باقی‌مانده بعد از سم‌پاشی نسبت به

قبل از سم‌پاشی با درصد وزن تر و وزن خشک تک بوته سمپاشی شده نسبت به شاهد سمپاشی نشده بود (بین ۰/٥٤ تا ۰/٥۹).

الف (A)

ب (B)

شکل ۱- الف: بیوتیپ حساس Zs (گلدان‌های سمت راست و چپ به ترتیب بیوتیپ حساس به علف کش کلودینافوپ پروپارژیل سمپاشی نشده و سمپاشی شده هستند.). ب: بیوتیپ مقاوم Z15 (گلدان‌های سمت راست و چپ به ترتیب بیوتیپ مقاوم سمپاشی نشده و سمپاشی شده هستند.)

Figure 1– A: Susceptible biotype, Zs (right and left pots are untreated and treated with clodinafop-propargyl herbicide, respectively) and resistant biotype, Z15 (right and left pots are untreated and treated with herbicide, respectively).

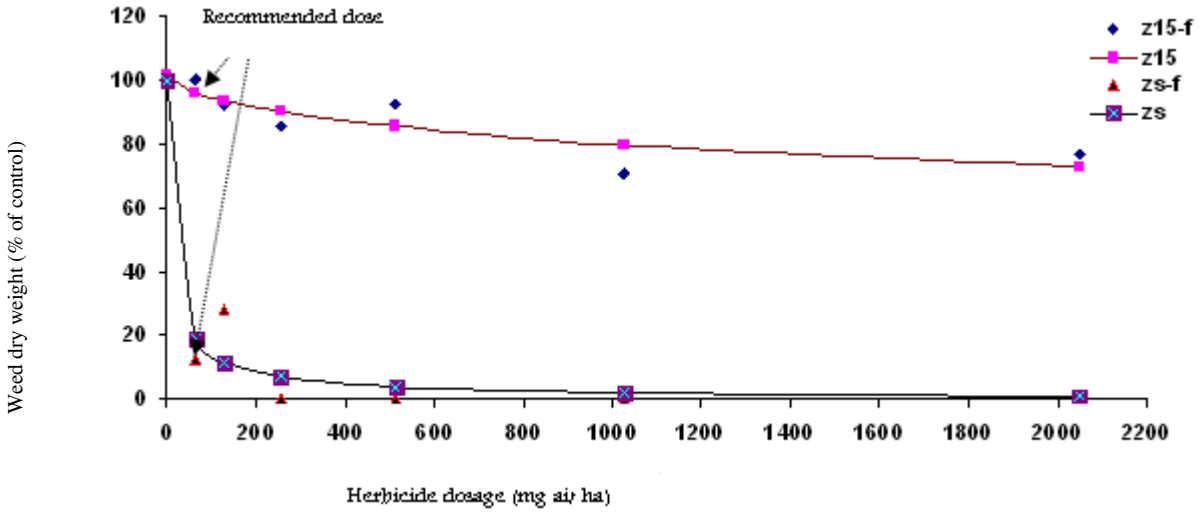
آزمایش دز پاسخ

درصد وزن تر نسبت به شاهد: ضرایب بدست آمده از معادله‌های برازش داده شده به داده‌های مربوط به درصد وزن تر توده‌های مختلف یولاف وحشی ۳۰ روز پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل نسبت به شاهد بدون سم‌پاشی (جدول ٤) حاکی از آن است که درجه مقاومت توده های Z15، Z9، Z13، Z8، Z19، Z17 و Z1 به ترتیب برابر ۱۰۲٦، ۱۱۸، ۱۳۱، ۸۰، ٦۹، ٦۳، و ٥۹ بود. توده Z15 مقاوم‌ترین توده از نظر درصد وزن تر نسبت به شاهد بدون سم‌پاشی بود و در دز ۲۰۰۰ گرم ماده مؤثره در هکتار حداکثر کاهش ۲۰ درصدی را نشان داد (شکل ٤ و ٥).

جدول ٤- ضرایب بدست آمده از معادله برازش شده به داده‌های درصد وزن تر توده‌های حساس و مقاوم نسبت به شاهد بدون علفکش، ۳۰ روز بعد از سم‌پاشی با علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل

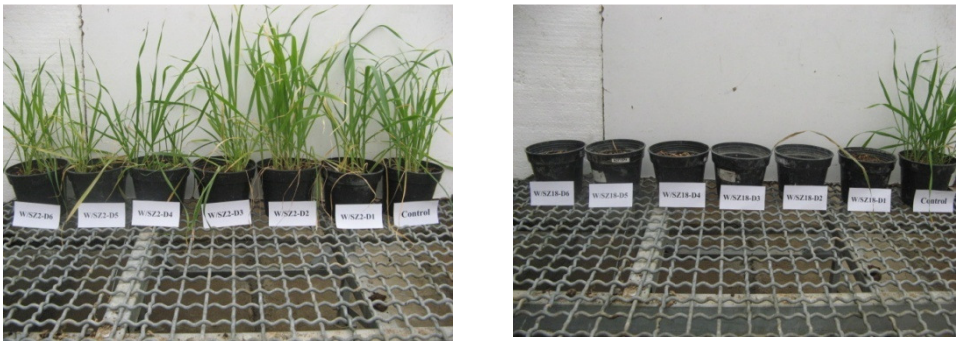
Table 4– Parameters estimates obtained for fresh weight of susceptible and resistant biotypes as a percentage of untreated controls, 30 day after spraying with clodinafop- propargil.

Biotypse	C	D	b	GR_{50}	R^2	R/S
Z1	_	101.8278	0.8304	638.7529	0.92	59.68
Z3	5.4917	100.7875	1.8245	131.4182	0.99	12.28
Z4	7.9262	100.0163	1.5456	30.1014	0.99	2.81
Z5	20.9477	102.1705	2.5502	307.1573	0.97	28.70
Z6	16.6547	102.0681	2.6707	252.5219	0.98	23.59
Z7	0	100.2176	0.7285	27.7133	0.83	2.58
Z8	7.5030	100.4464	1.9587	864.6976	0.99	80.80
Z9	12.3453	99.5102	18.918465	1268.4894	0.99	118.53
Z10	31.6936	96.7666	2.3978	534.7105	0.97	49.96
Z12	21.8336	100.0002	19.6864	499.6824	0.99	46.69
Z13	_	101.0296	1.5017	1408.9362	0. 97	131.65
Z14	6.650	86.3394	0.7922	36.4898	0.95	3.40
Z15	_	101.5568	0.5495	10984.3235	0.73	1026.41
Z16	0	95.1623	0.8059	222.3126	0.79	20.77
Z17	27.7013	97.8222	3.5271	682.3375	0.98	63.76
Z19	11.0220	97.4871	6.6420	742.2955	0.99	69.36
Z20	6.2462	102.6104	3.0349	263.1229	0.98	24.58
Z (s)	–	99.9415	0.8114	10.7016	0.95	–



شکل ٤- واکنش توده‌های حساس (Zs) و مقاوم (Z15) به غلظت های مختلف علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل از نظر وزن تر اندام هوایی. خطوط نشان دهنده خط برازش داده شده و علامت ها نشان دهنده داده های واقعی می باشند.

Figure 4– Response of of susceptible (zs) and resistant (z15) biotype fresh weight to different concentrations of clodinafop-propargil herbicide , as a percentage of untreated controls. Symbols and lines represent actual and estimated response of resistant and susceptible biotypes, respectively.



شکل۵. مقایسه بیوتیپ حساس (سمت راست توده Zs) و مقاوم (سمت چپ توده Z15) در آزمایش واکنش به دز.

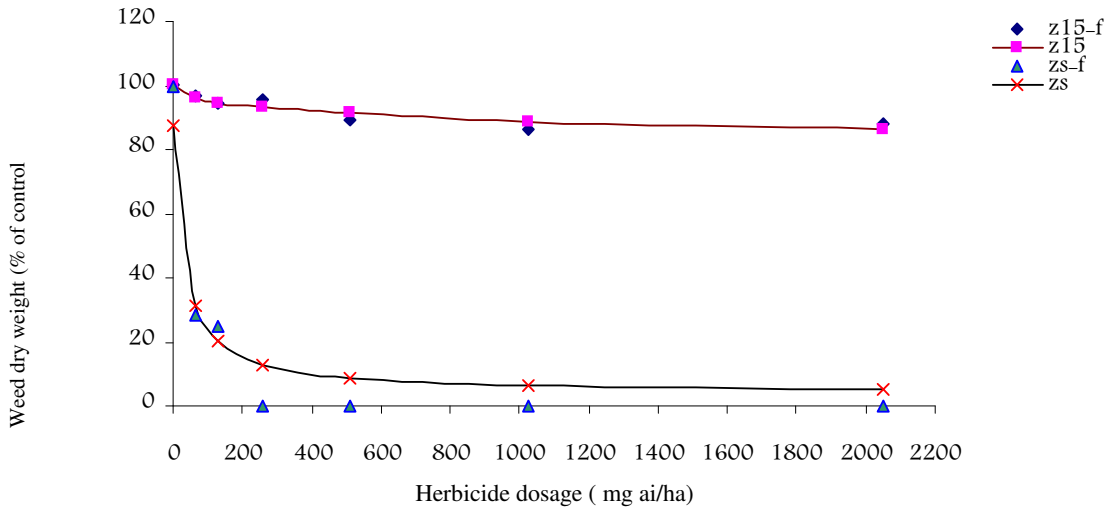
Figure 5.Comparison of susceptible (Zs) and resistant (Z15) biotypes in dose response experiment

درصد وزن خشک نسبت به شاهد: ضرایب بدست آمده از معادله‌های برازش داده شده به داده‌های مربوط درصد وزن خشک توده‌های مختلف یولاف‌وحشی ۳۰ روز پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل نسبت به شاهد بدون سم‌پاشی (جدول ۵) حاکی از آن است که درجه مقاومت توده های Z15، Z9، Z8، Z1، Z19 و Z10 به ترتیب برابر۷٦۱۷، ٦۰، ۳۱، ۱۹،۱۷ و ۱٦ بود. وزن خشک توده حساس در دز توصیه شده حدود ۸۰ درصد کاهش یافت، ولی توده Z15 که مقاوم‌ترین توده از نظر درصد وزن خشک نسبت به شاهد بدون سم‌پاشی بود، در دز ۳۲ برابر دز توصیه شده، ۹۰ درصد وزن خشک خود را حفظ نمود (شکل ٦).

جدول ۵- ضرایب بدست آمده معادله برازش شده به داده‌های درصد وزن خشک توده‌های حساس و مقاوم نسبت به شاهد، ۳۰ بعد از سم‌پاشی علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل

Table 5- Parameters estimates obtained for shoot dry weight of susceptible and resistant biotypes as a percentage of untreated controls, 30 day after spraying clodinafop- propargil.

biotype	C	D	b	GR_{50}	R^2	R/S
Z1	-	100.0981	0.7697	684.5985	0.93	19.35
Z3	23.7636	100.3555	1.0773	125.9879	0.97	3.56
Z4	16.7570	99.9606	2.3694	49.9251	0.98	1.41
Z5	40.1638	100.7451	4.7906	249.5443	0.95	7.05
Z6	15.1570	99.7397	1.5040	239.1925	0.99	6.76
Z7	-	98.6351	0.6531	93.8931	0.84	2.65
Z8	5.4294	102.2700	1.1375	1119.5599	0.98	31.65
Z9	-	98.0515	0.4245	2124.7457	0.79	60.06
Z10	35.8429	95.3179	1.7947	567.7757	0.96	16.05
Z12	31.6308	100.0090	11.9995	481.6372	1.00	13.61
Z13	45.0397	98.3445	17.7837	474.1016	0.98	13.40
Z14	-	99.9325	0.4967	40.2735	0.94	1.13
Z15	-	100.4263	0.3677	269432.98	0.85	7617.1
Z16	-	96.3805	0.8023	189.5476	0.88	5.35
Z17	48.8029	95.2320	7.7444	525.3739	0.96	14.85
Z19	28.7625	100.0004	43.9262	619.9580	0.99	17.52
Z20	15.0395	98.7513	3.5985	304.2692	0.99	8.60
Z (s)	-	99.8801	1.3130	35.3719	0.98	



شکل ٦- واکنش توده‌های حساس (Zs) و مقاوم (Z15) به غلظت های مختلف علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل از نظر وزن خشک اندام هوایی. خطوط نشان دهنده خط برازش داده شده و علامت ها نشان دهنده داده های واقعی می باشند.

Figure 6– Response of of susceptible (zs) and resistant (z15) biotype dry weight to different concentrations of clodinafop-propargil herbicide, as a percentage of untreated controls. Symbols and lines represent actual and estimated response of resistant and

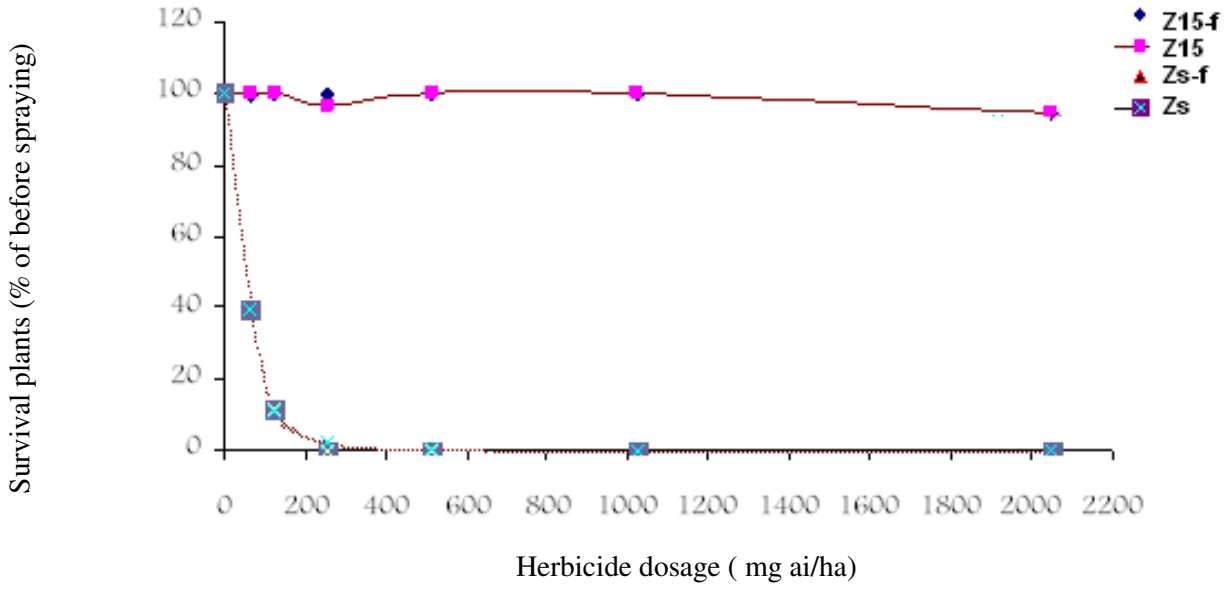
تعداد یولاف‌وحشی باقی‌مانده در ۳۰ روز پس سم‌پاشی نسبت به قبل از سم‌پاشی: ضرایب بدست آمده از معادله‌های برازش داده شده به داده‌های مربوط به درصد تعداد توده‌های مختلف یولاف‌وحشی باقی‌مانده در ۳۰ روز پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل نسبت به قبل از سم‌پاشی (جدول ٦) حاکی از آن است که درجه مقاومت توده های Z17، Z12، Z9، Z13 و Z15 به ترتیب برابر١١٦، ١٠١، ٩٢، ٩٠ و ٤٠ بود.

درصد تعداد توده‌های مختلف یولاف‌وحشی باقی‌مانده در ۳۰ روز پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل نسبت به قبل از سم‌پاشی حدود ۹۰ درصد کاهش یافت، ولی توده Z15 که مقاوم‌ترین توده از این نظر بود، در دز ۳۲ برابر دز توصیه شده ۷۰ درصد تعداد خود را پس از سم‌پاشی حفظ نمود (شکل ۷).

جدول٦- ضرایب بدست آمده از معادله برازش شده به داده های مربوط درصد تعداد توده‌های مختلف یولاف‌وحشی باقی‌مانده در ۳۰ روز پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ‌پروپارژیل نسبت به قبل از سم‌پاشی

Table 6– Parameters estimates obtained for survivel of susceptible and resistant biotypes 30 day after spraying with clodinafop- propargil than before spraying.

biotype	*C*	*D*	*b*	GR_{50}	R^2	*R/S*
Z1	-	97.4996	2.4393	1147.8656	0.97	21.22
Z3	35.7143	96.9623	13.0954	531.1758	0.97	9.82
Z4	10.7143	99.2963	1.8626	100.8678	0.97	1.86
Z5	69.1071	98.4697	2.2798	569.2332	0.88	10.52
Z6	-	99.7944	0.7487	682.6313	0.93	12.62
Z7	3.4418	100.3027	1.7516	61.0132	0.97	1.12
Z8	46.8750	86.8555	29.0738	1762.7670	0.78	32.59
Z9	-	99.6361	1.5839	4990.2859	0.98	92.27
Z10	71.5447	100.2893	2.0966	1120.9576	0.99	20.72
Z12	-	101.9209	0.7803	5507.2609	0.80	101.83
Z13	31.7629	100.0445	0.8578	4902.0345	0.71	90.64
Z14	-	102.5176	1.8766	223.4203	0.99	4.13
Z15	-	101.2037	0.9076	2184.3391	0.90	40.39
Z16	-	99.9555	0.5256	6.8797	0.98	0.12
Z17	-	10.0009	0.7838	6306.6866	0.80	116.62
Z19	-	98.5846	1.1235	790.2716	0.89	14.61
Z20	-	88.8142	3.9307	1159.7681	0.92	21.44
Z (s)	-	99.9775	2.4410	54.0789	0.99	



شکل۷ – واکنش توده‌های حساس و مقاوم به غلظت‌های مختلف علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل از نظر درصد گیاهان زنده باقی مانده توده‌ها نسبت به شاهد. خطوط نشان دهنده خط برازش داده شده و علامت‌ها نشان دهنده داده‌های واقعی می‌باشند.

Figure 7- Effect of different concentrations of clodinafop- propargil herbicide on survival of susceptible and resistant biotypes, as a percentage of untreated controls. Symbols and lines represent actual and estimated response of resistant and susceptible biotypes, respectively.

آزمایش پتری

ضرایب بدست آمده از معادله‌های برازش داده شده به داده‌های مربوط به طول کلئوپتیل توده‌های مختلف یولاف وحشی پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل (شکل ۸ وجدول ۷) حاکی از آن است که درجه مقاومت توده های Z20، Z13، Z5، Z8 و Z17 به ترتیب برابر ۱٤۹، ۱٤۹، ۹۹، ٦٥ و ٦۰ بود. در این آزمایش GR_{50} مربوط به توده مقاوم Z20

و توده حساس Zs به ترتیب حدود ۲/۱۹۹ و ۰/۰۱٤ قسمت در میلیون بود (شکل ۸).

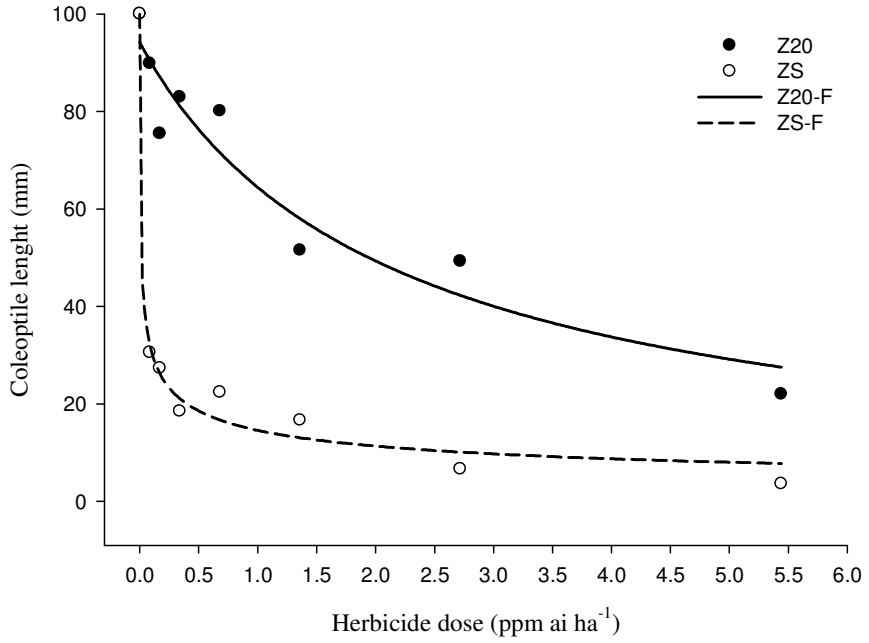
تال و همکاران (Tal *et al*., 2000)، معتقدند که عکس العمل گیاه کامل در شرایط گلخانه نسبت به واکنش آن در زیست سنجی بذر در شرایط پتری، به دلیل تفاوت روش و شرایط انجام آزمایش، متفاوت می‌باشد. بناکاشانی و همکاران (Bena Kashani *et al*., 2005)، نیز ضمن تائید نظر تال و همکاران (Tal *et al*., 2000) نشان دادند که علیرغم واکنش متفاوت توده‌های مورد آزمایش در دو روش زیست سنجی بذر در پتری و زیست سنجی گیاه کامل در گلخانه، در هر دو روش درجه مقاومت تودها، از یک همبستگی قابل قبولی برخوردار بود. در آزمایش بناکاشانی و همکاران درجه مقاومت محاسبه شده توده‌ها در روش زیست سنجی بذر به دلیل تفاوت شرایط آزمایش، پایین‌تر از روش بررسی گیاه کامل در شرایط گلخانه‌ای بود. بسیاری از محققین نیز معتقدند که روش زیست سنجی در مقایسه با روش های دیگر، روشی ساده، نسبتا سریع، ارزان و دقیق برای تشخیص توده‌های مقاوم یولاف وحشی به بازدارندگان ACCase است (Beckie *et al*.,2000).

جدول۷- ضرایب بدست آمده از معادله برازش شده به داده های مربوط به طول کلئوپتیل توده‌های مختلف یولاف‌وحشی پس از تیمار با علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل

Parameter estimates of the coleoptile's length of susceptible and resistant populations coleoptile's length as a percentage of –Table 7 untreated controls, after clodinafop-methyl application.

biotype	*C*	*D*	*b*	GR_{50}	R^2	*R/S*
Z1	-*	100.08976	0.8689	1.731	0.74	117.62
Z3	8.9009	100.0994	0.9140	0.048	0.98	3.28
Z4	2.3625	100.0039	0.6129	0.09	0.98	0.67
Z5	-*	99.3717	0.8525	1.463	0.92	99.43
Z6	4.3331	99.1284	1.6685	0.185	0.95	12.60
Z7	7.1704	99.9921	0.5256	0.010	0.99	0.69
Z8	29.3967	100.3365	3.8001	0.959	0.99	65.17
Z9	–*	99.8121	0.6493	0.143	0.99	9.76
Z10	–*	99.7172	1.1263	0.582	0.95	39.59
Z12	–*	94.8008	1.5048	0.811	0.95	55.12
Z13	–*	100.3265	0.3334	2.198	0.88	149.36
Z14	7.1374	100.2480	1.3950	0.069	0.94	4.69
Z15	4.0856	99.6874	1.0403	0.107	0.99	11.61
Z16	–*	99.5207	0.3640	0.084	0.93	5.73
Z17	–*	99.0934	1.0464	0.891	0.90	60.58
Z19	36.8696	103.4557	2.4486	0.168	0.96	11.42
Z20	–*	94.2469	0.9753	2.199	0.92	149.43
Z (s)	3.6064	99.9430	0.4878	0.014	0.98	

* 3 parameter model used



شکل ۸- واکنش توده‌های حساس (zs) و مقاوم (z20) به غلظت های مختلف علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل از نظر طول کلئوپتیل. خطوط نشان دهنده خط برازش داده شده و علامت ها نشان دهنده داده های واقعی می باشند.

Figure 8- Effect of different clodinafop-methyl concentrations on coleoptile elongation of susceptible (zs) and resistant (z20) populations compared with the untreated controls. Symbols and lines represent actual and estimated response, respectively.

آزمایش ملکولی

مطالعه ملکولی با دو پرایمر و برای تشخیص مقاومت علف هرز یولاف وحشی به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل ناشی از ایجاد جهش در دو موقعیت ۱۷۸۱ (Ile1781Leu) و ۲۰٤۱ (Ile2041Asn) آنزیم ACCase انجام شد (Preston, 2009; Yu *et al.*, 2007; Delye, 2005). پرایمر NsiII1781f/NsiI1 قطعه ۱٦٥ جفت بازی را تکثیر کرد (شکل۹، قسمت بالا) و پس از هضم آنزیمی (توسط آنزیم *Nsi*I) گیاهان هموزیگوت حساس باند ۱۳۰ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت مقاوم نیز هر دو باند ۱٦٥ جفت بازی و ۱۳۰ جفت بازی را نشان دادند. بر اساس نتایج بدست آمده از بین ۱۷ توده آزمایش شده که ۱٦ توده آن در روش‌های غیر ملکولی مقاوم تشخیص داده شده است، ۷ توده (٤٤ درصد) جهش در موقعیت ۱۷۸۱ (Ile1781Leu) را نشان دادند (شکل ۹ قسمت پایین). مطالعات قبلی که برای تشخیص مکانیزم های ملکولی ۱۹ توده یولاف وحشی انجام شده حاکی از آن است که از میان ۱۹ توده یولاف مقاوم، ۱۰ توده دارای جهش ژنتیکی در نقطه ۱۷۸۱ ژن کدکننده آنزیم ACCase بود (Gherekglo & Zand, 2010). پرستون (Preston, 2009) جهش در نقطه ۱۷۸۱ را فراوان ترین نوع جهش ذکر کرده است.

پرایمر ACCF1/ACCR1 قطعه ٤۹۲ جفت بازی را تکثیر کرد (شکل ۱۰ قسمت بالا) و پس از هضم آنزیمی (توسط آنزیم *Eco*RI) فقط گیاهان هموزیگوت حساس (Ile/Ile2041)که دو باند ۲۰۸ و ۲۸۲ جفت بازی را داشتند مشاهده شد (شکل ۱۰ قسمت پایین). بر اساس نتایج بدست آمده از بین ۱۷ توده آزمایش شده (که ۱٦ توده آن در روش های غیر ملکولی مقاوم تشخیص داده شده است، هیچ‌کدام جهش در موقعیت ۲۰٤۱ (Ile2041Asn) را نشان ندادند (شکل ۱۰ قسمت پایین).

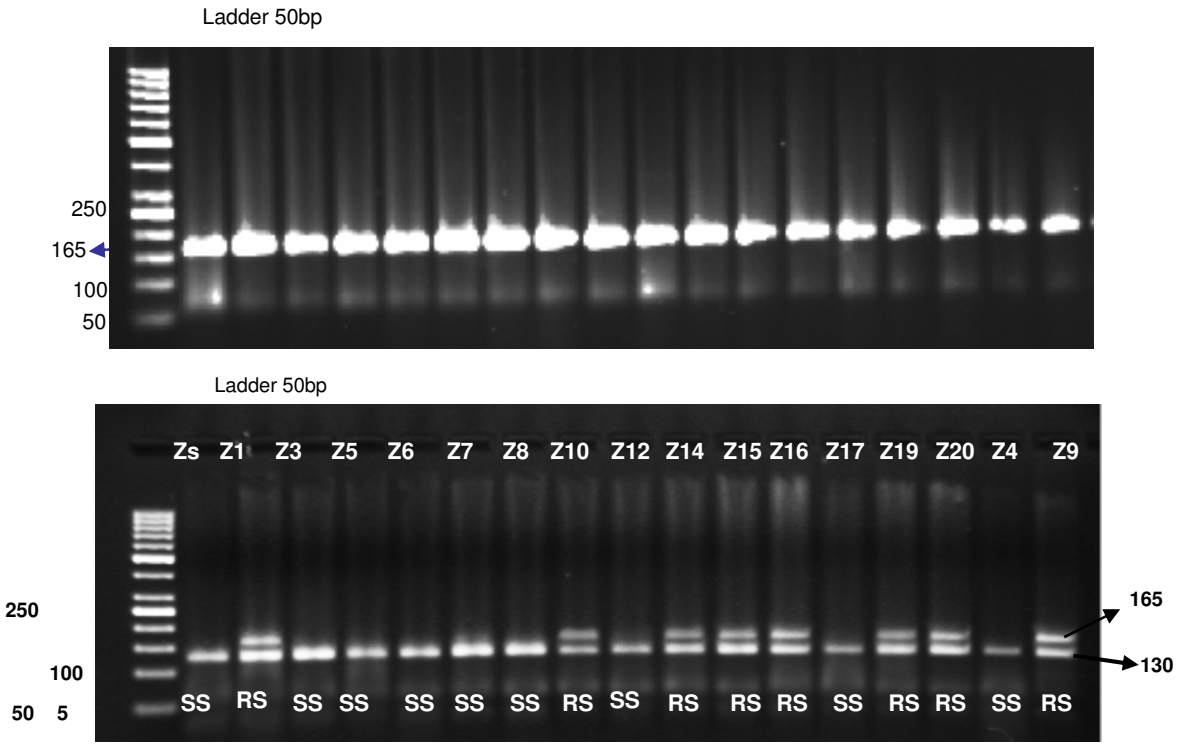
نتایج مطالعه ملکولی به روش dCAPS در مورد توده‌های مقاوم فالاریس جمع‌آوری شده از استان فارس نشان داد که

توده‌های فالاریس در نقطه ۱۷۸۱ دچار جهش ژنتیکی نشده بودند. ادامه مطالعه ملکولی بر مبنای پایروسکوئنسینگ[1] بر وی همان توده مقاوم فالاریس نشان از وجود جهش در نقاط ۲۰۲۷ در یک توده و ۲۰۷۸ در توده دیگر و وجود هر دو جهش در ژن کدکننده آنزیم استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز توده سوم بود (Gherekglo & Zand, 2010).

کاندان و ویناداس (Kaundun & Windass, 2006) از پرایمرهای NsiI1781f/NsiI1781781r جهت تکثیر قطعه ۱٦٥ جفت بازی استفاده کرده‌اند و پس از هضم آنزیمی محصول PCR، (توسط آنزیم *Nsi*I) گیاهان هموزیگوت مقاوم باند هضم نشده ۱٦٥ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت حساس باند ۱۳۰ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت نیز هر دو باند فوق را نشان دادند. یو و همکاران (Yu *et al*., 2007) در آزمایش دیگری جهت مشخص نمودن جاگزینی Asn به‌جای Ile در موقعیت ۲۰٤۱ از روش CAPS با پرایمرهای ACCF1/ACCR1 استفاده کردند. پس از هضم آنزیمی (توسط آنزیم *Eco*RI) گیاهان هموزیگوت مقاوم باند هضم نشده ٤۹۲ جفت بازی، گیاهان هموزیگوت حساس دو باند ۲۰۸، و ۲۸۲ جفت بازی و گیاهان هتروزیگوت نیز هر سه باند فوق را نشان دادند.

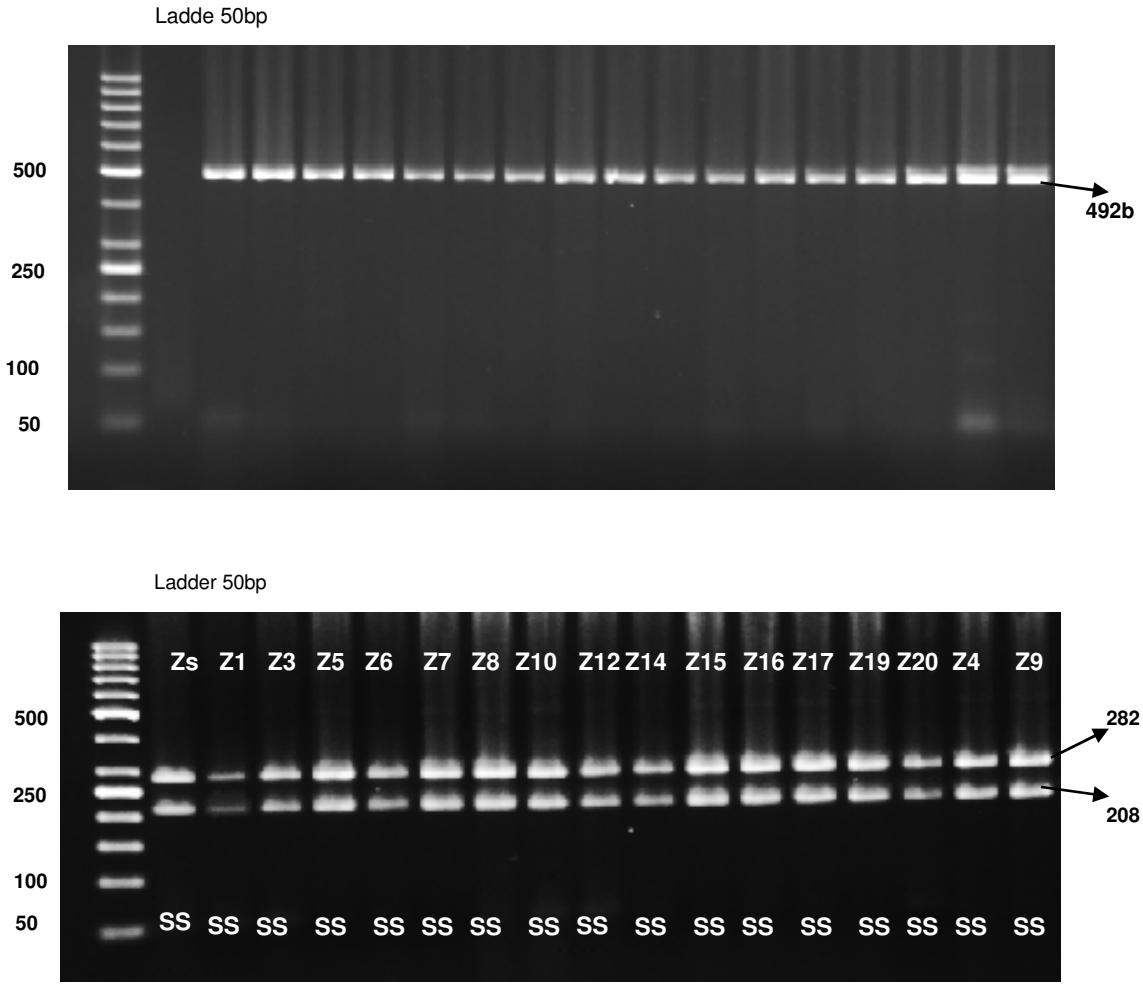
مقایسه نتایج آزمایش ملکولی با سایر روش های رایج: مقایسه نتایج حاصل از آزمایش ملکولی، غربال،گلدانی و پتری حاکی از آن است که بین آزمایش غربال، گلدانی و پتری همخوانی کامل برقرار است، ولی این سه آزمایش در برخی موارد (برای ۹ بیوتیپ) با آزمایش ملکولی همخوانی ندارند (جدول ۸ و شکل ۹). به عبارتی پرایمر تعیین کننده بروز جهش در نقطه ۱۷۸۱ (Ile/Leu1781) توانسته است با حدود ٤٤ درصد اطمینان بروز مقاومت را تعیین کند.این عدم همخوانی می‌تواند به دلیل بروز جهش در مکان‌های ژنی دیگر و یا افزایش متابولیسم در گیاه مقاوم باشد. با توجه به اینکه در این آزمایش فرض بر این بود که فراوان ترین جهش در منطقه ۱۷۸۱ اتفاق افتد، بنابراین احتمال دارد در بیوتیپ‌هایی که در آزمایش‌های غربال،گلدانی و پتری مقاوم، ولی در آزمایش ملکولی حساس تشخیص داده شدند، جهش در نقطه دیگری (غیر از منطقه ۲۰٤۱ که نتایج هیچ جهشی را نشان نداد) اتفاق افتاده باشد و یا مکانیزم دیگری مظیر افزایش متابولیسم باعث بروز مقاومت شود.

[1] Pyrosequencing



شکل ۹- نتایج حاصل از PCR (بالا) و برش آنزیمی با *Nsi*I (پایین). SS نشان دهنده بیوتیپ هموزیگوت حساس و RS نشان دهنده بیوتیپ هتروزیگوت مقاوم است.

Figure 9- Results of PCR (up) and enzyme digestion with *Nsi*I (down). SS show the susceptible homozygote biotype and RS shows the resistance heterozygote biotype.



شکل ۱۰- نتایج حاصل از PCR (بالا) و برش آنزیمی با *Eco*RI (پایین). SS نشان دهنده بیوتیپ هموزیگوت حساس است.

Figure 10-Results of PCR (up) and enzyme digestion with *Eco*RI (down). SS show the susceptible homozygote biotype.

جدول ۸-مقایسه نتایج حاصل از برش آنزیمی با سایر روش‌ها

Results of enzyme digestion in comparison with another methods. Table 8-

	Molecular trail	Screen trail	Bioassay trail					
biotype	**A mutation at codon 1781**	**A mutation at codon 2041**	**Density (% of before spraying)**	**Dry weight (% of control)**	**R/S (fresh weight)**	**R/S (dry weight)**	**R/S (Weed population)**	**R/S (length of coleoptiles)**
Z1	RS	SS	100	66	59.68	19.35	21.22	117.62
Z3	SS	SS	88	68	12.28	3.56	9.82	3.28
Z4	SS	SS	90	44	2.81	1.41	1.86	0.67
Z5	SS	SS	100	74	28.70	7.05	10.52	99.43
Z6	SS	SS	86	35	23.59	6.76	12.62	12.60
Z7	SS	SS	73	58	2.58	2.65	1.12	0.69
Z8	SS	SS	100	79	80.80	31.65	32.59	65.17
Z9	SS	SS	100	93	118.53	60.06	92.27	9.76
Z10	RS	SS	100	76	49.96	16.05	20.72	39.59
Z12	SS	SS	78	50	46.69	13.61	101.83	55.12
Z13	SS	SS	100	95	131.65	13.40	90.64	149.36
Z14	RS	SS	100	98	3.40	1.13	4.13	4.69
Z15	RS	SS	100	74	1026.41	7617.14	40.39	11.61
Z16	RS	SS	67	86	20.77	5.35	0.12	5.73
Z17	SS	SS	100	66	63.76	14.85	116.62	60.58
Z19	RS	SS	100	81	69.36	17.52	14.61	11.42
Z20	RS	SS	100	96	24.58	8.60	21.44	149.43
Zs	SS	SS	60	10	-			

منابع

Adkins, S., Wills, W. D., Boersma, M., Walker, S. R., Robinson, G., McLeod, R. J. and Einam, J.P. 1997. Weed resistance to chlorsulfuron and atrazine from the north-east grain region of Australia. Weed Res. 37: 343-349.

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.

Bena Kashani, F., Zand, E. and Mohammadalizadeh, H. 2005. Quick test to evolution resistance of wild oat (*Avena luduviciana*) to aryloxyphenoxypropionate herbicides using seed bioassay. Proceeding of the 1st Iranian Weed Science Congress. Iranian Research Institute of Plant Protection. Tehran. 492-495

Corbett, C. L. and Tardif, F. J. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. Pest Manage Sci, 62: 584-597.

Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Mol Ecol. 1: 233-240.

De Prado, R., Gonzalez-Gutierrez, J., Menendez, J., Gasquez, J., Gronwald, J. W. and Gimene-Espinoza, R. 2000. Resistance to acetyl CoA carboxylase-inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. Weed Sci. 48: 311-318.

Deihimfard, R., Zand, E., Mahdavi Damghani, A. M. and Soufizadeh, S. 2007. Herbicide risk assessment during the wheat self-sufficient project in Iran. Pest Manage Sci. 63: 1036-1045.

Delye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. Weed Sci. 53: 728-746.

Gherekhlo, J. and Zand, E. 2010. A short review on conducted herbicide-resistance researches in Iran. Key articles of 11th Iranian Crop Science

Congress. Shahid Beheshti University. Tehran. 110-125.

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.

Konieczny, A. and Ausubel, F. M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 4: 403–410.

Moss, S. R., Clarke, J. H., Blair, A. M., Culley, T. N., Read, M. A., Ryan, P. J. and Turner, M. 1999. To occurrence of herbicide-resistance grass-weeding in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assay. Proceeding of Brighton Crop Protection Conference on Weeds. Hampshire, UK: BCPC. 179-184.

Moss, S. R., Perryman, S. A. M. and Tatnell, L. V. 2007. Managing herbicide-resistant black grass (*Alopecurus myosuroides*): Theory and practice. Weed Technol. 21: 300-309.

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.

Preston, C. 2009. Herbicide resistance: Target site mutation. In: C. Neal Stewart Jr. Weedy and Invasive Plant Genomics. Wiley Blackwell. Pp. 127-148.

Ritz, C. and Streibig, J. C. 2005. Bioassay analysis using R. J Stat Softw. 12: 1-21.

Sandral, G. H., Dear, B. S., Pratley, J. E. and Cullis, B. R. 1997. Herbicide dose response rate response curve in subterranean clover determined by a bioassay. Aust J Exp Agr. 37: 67-74.

Streibig, J. C. 1988. Herbicide bioassay. Weed Res. 28: 479-4840.

Tal, A., Kotoula, E. and Rubin, B. 2000. Seed bioassay to detect grass weeds resistance to acetyl coenzyme-A inhibiting herbicides. Crop Protect. 467-472.

Yu, Q., Zheng, M., Owen, M., Sattin, M. and Powles, S. B. 2007. Diversity of acetyl- coenzyme A carboxylase mutations in resistance *Lolium* population: Using clethodim. Plant Physiol. 145: 547-558.

Zand, E., Baghestani, M. A., Nezamabadi, N. and Shimi, P. 2010. The most important herbicides and weeds of Iran. Iran University Press.

Zand, E. and Beckie, H. 2002. Competitive ability of hybrid and open pollination canola (*Brassica napus* L.) with wild oat (*Avena fatua* L.).Canadian J. of Plant Sci. 82: 473-480.

Using the dCAPS Method to Detect the Resistance of Wild Oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) to Clodinafop-propargyl in Comparison with Current Methods

Eskanar Zand[1], Arash Razmi[1], Fatemeh, Benakashani[I], ,Fahimeh Nazari[1],. and Javid Gharakhloo[2].

1. Weed Research Department of Iranian Research Institute of Plant Protection, 2. Gorgan University

Abstract

In order to evaluate the resistance of 17 biotypes of wild oat to clodinafop-propargyl herbicides, four methods including: whole plant screening, whole plant bioassay, seedling bioassay and molecular method were used. There was similarity between the results of whole plant screening, whole plant bioassay, seedling bioassay, but resistance ratio (R/S) of seedling bioassay was lower than whole plant bioassay and it seems that seedling bioassay is a reliable method for identifying populations of grass species resistant to ACCase inhibiting herbicides. According to the molecular methods, an isoleucine-1781-leucine [Leu] mutation in plastidic ACCase enzyme of 8 biotypes (44% of biotypes) has been identified as the known mutation endowing clodinafop-propargyl resistance and isoleucine-2041-asparagine mutation has not been identified as a mutation endowing resistance in none of biotype. The resistance mechanism of the rest of biotypes that were resistance according to the non-molecular method, but did not identify resistant by molecular method, can be explained by mutation in another location or metabolism-based mechanism.

Key words: Grass weeds, ACCase inhibitors, resistance, whole plant assay, seed bioassay.