



Original Article

Investigating the Resistance Mechanisms of Wild Mustard (*Sinapis arvensis*) to the Herbicide Tribenuron-Methyl

Ashkan Bahmani Fathabadi^{1,2}, Eskandar Zand^{3*}, Shahram Lak², Ahmad Naderi⁴,
Mahmood Masoumi⁵

1. Department of Agronomy, Ahvaz Science and Research Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
2. Department of Agronomy, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
3. Weed Research Department, Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran.
4. Agricultural and Natural Resources Research Center, Khuzestan, Iran.
5. Plant Protection Department, Agricultural and Natural Resources Research Center, Fars, Iran.

Article Info

Received:
January 22, 2024

Accepted:
May 14, 2024

First published online:
June 21, 2024

Corresponding Author:
Eskandar Zand
Email:
eszand@yahoo.com

Key words: DNA
extraction, gene
sequencing, herbicide
resistance, microneedle.

Abstract

The present experiment set out to rapidly detect some mechanisms of resistance to the herbicide tribenuron-methyl in *Sinapis arvensis*. For this purpose, a chitosan microneedle was utilized to extract DNA, and then, to detect mutations, sequencing of the acetolactate synthase (ALS) gene through PCR product was carried out. During a separate process, the insecticide malathion was also used to determine the metabolic resistance mechanism. The results of the present study indicated that using the microneedle reduced the DNA extraction time to five minutes compared to the conventional approach. The ALS gene sequences in the FR3 (resistant) and S (susceptible) populations did not differ from the sensitive sequences available in GenBank; therefore, no mutations were observed in the gene. In a dose-response experiment with different doses of the herbicide tribenuron-methyl (up to eight times the recommended dose; that is, 20 grams of active ingredient per hectare), applied with pretreatment of malathion (a dose of 1000 grams of active ingredient per hectare) two hours before the herbicide treatments, and without malathion pretreatment as well, the resistant FR3 population had 23 times more resistance than the susceptible (S) population in the presence of tribenuron-methyl and without malathion pretreatment. Pretreatment with malathion significantly ($p \leq 0.01$) reduced herbicide resistance ($RI = 1.15$) in the FR3 population, which indicated metabolism-based resistance to tribenuron-methyl.

Cite this article: Bahmani Fathabadi, A. Zand, E. Lak, S. Naderi, A. and Masoumi, M. (2024). Investigating the resistance mechanisms of wild mustard (*Sinapis arvensis*) to the herbicide tribenuron-methyl. Iran. J. of Weed Sci. 20(1): 133-146. DOI: 10.22034/ijws.2025.367284.1473.



مقاله پژوهشی

بررسی مکانیزم‌های مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل در علف هرز خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.)

اشکان بهمنی‌فتح‌آبادی^۱، اسکندر زند^{۲*}، شهرام لک^۲، احمد نادری^۳، محمود معصومی^۴

۱- گروه زراعت، واحد علوم و تحقیقات اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۲- گروه زراعت، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۳- بخش تحقیقات علف‌های هرز، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران.

۴- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، خوزستان، ایران.

۵- بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، فارس، ایران.

چکیده

هدف از انجام آزمایش، تشخیص سریع بعضی از مکانیزم‌های مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل در علف هرز خردل وحشی (*Sinapis arvensis*) بود که به این منظور از میکرونی‌دیل کیتوزان جهت استخراج DNA و از توالی‌یابی ژن استولاکتات سنتاز (ALS) جهت تشخیص جهش و همینطور استفاده از مالاتیون برای تعیین مکانیزم مقاومت متابولیکی استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد استفاده از میکرونی‌دیل، مدت زمان استخراج DNA را نسبت به روش معمولی، به پنج دقیقه کاهش داد. توالی‌های ژن ALS در توده‌های FR3 (مقاوم) و S (حساس) در مقایسه با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن تفاوتی نداشته؛ در نتیجه هیچ‌گونه جهشی در ژن مذکور مشاهده نشد. در آزمایش دز-پاسخ با دزهای مختلف علف‌کش تری‌بنورون‌متیل (تا هشت برابر دز توصیه‌شده ۲۰ گرم ماده موثره در هکتار) که با پیش‌تیمار مالاتیون (دز ۱۰۰۰ گرم ماده موثره در هکتار) دو ساعت قبل از تیمارهای علف‌کش و همینطور بدون پیش‌تیمار مالاتیون اعمال شدند، توده مقاوم FR3 نسبت به توده حساس (S)، ۲۳ برابر مقاومت بیشتر در حضور علف‌کش تری‌بنورون‌متیل و بدون پیش‌تیمار مالاتیون داشت. همچنین پیش‌تیمار مالاتیون نسبت به عدم استفاده از آن به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.01$) درجه مقاومت توده FR3 را کاهش داد ($RI = 1/15$) که نشان‌دهنده مکانیزم مبتنی بر متابولیسم تری‌بنورون‌متیل در توده فوق می‌باشد.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت:

۱۴۰۲/۱۱/۰۲

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۳/۰۲/۲۵

تاریخ انتشار برخط:

۱۴۰۳/۰۴/۰۱

نویسنده مسئول:

اسکندر زند

ایمیل:

eszand@yahoo.com

واژه‌های کلیدی: استخراج

DNA، توالی‌یابی ژن، مقاومت به علف‌کش، میکرونی‌دیل.

استناد: بهمنی‌فتح‌آبادی، ا.، زند، ا.، لک، ش.، نادری، ا. و معصومی، م. (۱۴۰۳). بررسی مکانیزم‌های مقاومت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل در علف هرز خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.). دانش علف‌های هرز ایران، ۲۰(۱): ۱۳۳-۱۴۶.

Doi: 10.22034/ijws.2025.367284.1473

مقدمه

علف‌کش‌ها نقش موثری در افزایش عملکرد گیاهان زراعی دارند، زیرا به‌طور میانگین عملکرد گیاهان زراعی در اثر رقابت با علف‌های هرز ۲۳٪ کاهش می‌یابد؛ به همین دلیل در سال ۲۰۱۹ سهم جهانی فروش علف‌کش‌ها از کل آفت‌کش‌ها، ۴۷/۵٪ بوده است (Sharma *et al.*, 2019). از اولین علف‌کشی که در سال ۱۹۴۰ تولید شد تاکنون تکنولوژی تولید علف‌کش‌ها بسیار پیشرفت داشته است. هرچند علی‌رغم تولید علف‌کش‌هایی با محل هدف کاملاً اختصاصی، همچنان چالش‌هایی در استفاده از علف‌کش‌ها وجود دارند؛ از جمله انتخابی‌بودن علف‌کش‌ها برای گیاهان زراعی به دلیل شباهت زیاد محل هدف علف‌کش در گیاه زراعی و علف‌هرز که این موضوع باعث می‌شود کشف مولکول جدید علف‌کش با مشکل مواجه شود (Gianessi, 2013). یکی از مکانیزم‌های اصلی انتخابی‌بودن علف‌کش برای گیاه زراعی، قابلیت متابولیسم علف‌کش توسط گیاه زراعی است که در این حالت تجزیه علف‌کش توسط آنزیم‌های سیتوکروم پی ۴۵۰ (CYP450)؛ گلوکوزیل-ترانسفراز^۲ و گلوکاتایون-اس-ترانسفراز^۳ صورت می‌گیرد (Mallory-Smith & Sanchez, 2011; Lamberth *et al.*, 2013).

در حال حاضر در سطح جهانی، ۵۳۳ مورد مقاومت به علف‌کش (گونه × محل هدف) در ۲۷۳ گونه علف‌هرز نسبت به ۲۱ علف‌کش با نحوه عمل

متفاوت از کل ۳۲ علف‌کش ثبت‌شده موجود گزارش شده است. مصرف متوالی علف‌کش‌ها با نحوه عمل یکسان یکی از عوامل اصلی بروز مقاومت در علف‌های هرز می‌باشد (Heap, 2024). مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها به دو گروه مقاومت وابسته به محل هدف (TSR)^۴ و مقاومت غیر وابسته به محل هدف (NTSR)^۵ طبقه‌بندی می‌شوند. علف‌کش‌های بازدارنده ALS به صورت انتخابی برای کنترل علف‌های هرز پهن‌برگ و باریک‌برگ مصرف می‌شوند و به دلیل کنترل طیف وسیعی از علف‌های هرز و مقدار کم مصرف به عنوان ابزار مهمی در مدیریت شیمیایی علف‌های هرز به کار می‌روند (Mazur & Falco, 1989). در ایران برای اولین بار در سال ۲۰۰۹ خردل وحشی مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده ALS در مزارع گندم استان‌های فارس، گلستان، خوزستان و کرمانشاه گزارش شد (Axhgar *et al.*, 2022). جهش‌های ژن ALS که تاکنون شناسایی شده و باعث بروز مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ALS می‌شوند شامل Ala122، Arg377، Asp376، Trp574، Ser653 و Gly654 می‌باشند (Bahmani *et al.*, 2016; Tranel *et al.*, 2019; Khaledi *et al.*, 2020). هرچند بیشتر جهش‌های ژن ALS در علف‌های هرز تیمار شده با علف‌کش‌های بازدارنده ALS در جایگاه‌های ژنی Pro-197 و Trp574 شناسایی شدند (Yu & Powels, 2014).

4Target-site resistance

5Non-target-site resistance

1Cytochrome P450

2Glucosyltransferase

3Glutathione S-transferase

یکسان اتفاق می‌افتد (Gaines *et al.*, 2020). در نتیجه جهش در جایگاه فعال آنزیم، علف‌کش قادر نیست به محل هدف خود متصل شود به همین دلیل فعالیت آنزیم متوقف نشده و یا به عبارتی علف‌کش کارایی نخواهد داشت. بنابراین پدیده مقاومت به علف‌کش یک چالش جدی در کشف مولکول‌های جدید علف‌کش می‌باشد (Evans *et al.*, 2016).

در سال‌های اخیر، تحقیقات بسیار زیادی در زمینه شناخت مکانیزم‌های مقاومت به علف‌کش در علف‌های هرز انجام شده و بر اساس آن‌ها روش‌های مدیریتی نیز ارائه شده است. نکته مهم این است که با توجه به ادامه روند تکامل مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها لازم است همچنان مکانیزم‌های مقاومت شناسایی شده و بر اساس آن‌ها مولکول‌های علف‌کش جدید ساخته شوند (Tranel *et al.*, 2019).

کیتوزان پلیمر کربوهیدرات طبیعی است که از دی‌استیله شدن کتین از طریق روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی به دست می‌آید و در پوست میگو و خرچنگ به مقدار زیاد وجود دارد و تا حدود زیادی خاصیت آنتی‌باکتری و قارچ‌کشی داشته و در مواردی ویروس‌ها را نیز کنترل می‌کند (Campos *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010). تاکنون تنها سه مورد استفاده از میکرونیدل جهت استخراج DNA از گیاه گزارش شده که از پلی‌ونیل-الکل (PVA) ساخته شده‌اند. PVA پلیمر مصنوعی محلول در آب است و مدت زمان جذب محتویات سلولی از این طریق یک دقیقه می‌باشد

در میان علف‌های هرز پهن‌برگ در مناطق مختلف ایران، علف‌های هرز خردل وحشی، پنیرک (*Malva neglecta*)، خارمریم (*Silybum marianum*)، آمی (*Ammi majus*)، شلمی (*Rapistrum rugosum*)، خاکشیر (*Descurainia Sophia*)، صابونک (*Vaccaria hispanica*)، بی‌تی‌راخ (*Galium aparine*)، یونجه زرد (*Melilotus indicus*) و تربچه وحشی (*Raphanus raphanistrum*) به علف‌کش تری-بنورون متیل مقاوم شده‌اند (Tahmasebi *et al.*, 2024). از بین علف‌های هرز باریک‌برگ، علف‌های هرز چچم، خونی‌واش، سوروف و یولاف وحشی به یک یا دو گروه از علف‌کش‌ها مقاوم شده‌اند (Haghnama & Mennan, 2020; Sasanfar *et al.*, 2021).

در مجموع مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase، ALS و علف‌کش‌های اکسینی در مقایسه با سایر علف‌کش‌ها، شایع‌تر است و بیشترین مکانیزم مقاومت شناسایی شده از نوع مقاومت TSR بوده هر چند مقاومت متابولسمی نسبت به علف-کش‌های اکسینی در علف‌های هرز بی‌تی‌راخ گزارش شده است (Nosrati & Muhammadyari, 2018). در مقاومت TSR، بیشترین گزارش‌ها حاکی از تغییر ساختار و فعالیت آنزیم محل هدف علف‌کش در اثر جهش (تغییر اسیدهای آمینه) می‌باشد که در اثر مصرف متوالی علف‌کش‌های با نحوه عمل

به منظور مدیریت علف‌های هرز نیاز است اطلاعات ژنومی آن‌ها در مقیاس وسیع در دسترس باشد. در این راستا، بایستی نمونه‌های متعددی از مناطق مختلف مورد بررسی قرار گیرند که در شرایط فعلی، نمونه‌برداری از علف‌های هرز مشکوک به مقاومت و ارسال آن‌ها به آزمایشگاه زمان زیادی لازم داشته و کیفیت نمونه‌ها نیز کاهش می‌یابد. بنابراین در این تحقیق با استفاده از میکرونی‌دیل کیتوزان امکان استخراج سریع DNA از بافت برگ تازه و بررسی مکانیزم‌های مقاومت مبتنی بر محل هدف و نیز مقاومت متابولسمی با کاربرد مالاتیون در علف هرز خردل وحشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذر خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) از مزرعه گندم فیروزآباد واقع در روستای خوید مبارکه با ارتفاع ۷۳۵ متر از سطح دریا، طول جغرافیایی ۳۴ دقیقه، ۲۵ درجه و عرض جغرافیایی ۴۷ دقیقه، ۲۸ درجه در سال زراعی ۱۳۹۳ درحالی که کشاورز از کنترل خردل وحشی توسط علف‌کش‌های بازدارنده ALS ناراضی بود جمع‌آوری شد. در مرحله بعد این توده مشکوک به مقاومت (FR3) به همراه توده دیگر جمع‌آوری شده از مزارع دیم که در آن از علف‌کش استفاده نشده بود (توده S) وارد آزمایش غربال شدند که در آزمایش مذکور هر دو توده (FR3) و (S) با استفاده از دز توصیه‌شده علف‌کش تری‌بنورون‌متیل (۲۰ گرم ماده موثره در هکتار) در مرحله سه تا چهار برگی سمپاشی شدند که بر اساس

(Rajesh et al., 2019; Osterman et al., 2020; Selz et al., 2023).

میکرونی‌دیل‌ها در حوزه علوم پزشکی و در زمینه تحقیقات، درمان و انتقال دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند و به تازگی از میکرونی‌دیل‌ها جهت شناسایی ژنومی عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده می‌شود که جنس این نوع میکرونی‌دیل‌ها از پلی‌ونیل‌الکل است (PVA) تا به دلیل استحکام زیاد بتوانند از دیواره سلولی گیاهی عبور کرده و محتویات سلول را جذب نمایند (Trout et al., 1997; Rajesh et al., 2019; Ostermann et al., 2020). میکرونی‌دیل دیگری از جنس کیتوزان وجود دارد که کربوهیدرات بوده و قابل تجزیه است؛ به همین دلیل ضمن سازگاری با طبیعت دارای خواص آنتی-باکتریایی و قارچ‌کشی می‌باشد (Campos et al., 2010; Kong et al., 2010). تغییر در ساخت میکرونی‌دیل کیتوزان و استحکام-بخشیدن به نیدل‌ها، از این نوع میکرونی‌دیل با توجه به خواص فوق می‌توان به منظور استخراج DNA از بافت گیاه و تحقیقاتی که نیاز است ماده‌ای به بافت خاصی از گیاه وارد شود و نیز در کشاورزی دقیق جهت افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی استفاده کرد. زمانی که از برگ گیاه در حال رشد با میکرونی‌دیل کیتوزان، استخراج DNA صورت می‌گیرد با توجه به گزارش تحقیقات انجام‌شده روی سایر موجودات احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌باکتریایی و قارچ‌کشی، خراش‌های روی برگ از ورود عوامل بیماری‌زای فوق جلوگیری کرده و گیاه آلوده نشده و به رشد خود ادامه می‌دهد.

$$Y = \left[\frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_0} \right)^b} \right] \quad \text{معادله (۱)}$$

a حد بالایی، b شیب منحنی، X دز علف‌کش، X_0 دز علف‌کش که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقاء می‌شود (LD_{50})، Y درصد بقاء نسبت به شاهد و شاخص مقاومت RI^Y توده FR3، از معادله ۲ محاسبه شد.

$$RI = \frac{LD_{50}FR3}{LD_{50}S} \quad \text{معادله (۲)}$$

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درجه مقاومت (RI) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسات میانگین بر اساس آزمون t در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) انجام شد.

بررسی جهش‌های احتمالی در بروز مقاومت به علف‌کش

الف) استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB (Aboul-Muaty & Oraby, 2019)

در استخراج DNA به روش CTAB ابتدا حدود ۲۰ میلی گرم از نمونه برگ خردل وحشی توسط نیتروژن مایع پودر شده و داخل ویال ۱/۵ میلی لیتر ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB به آن اضافه و ورتکس شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱:۲۴ ایزوآمیل الکل:کلروفرم به نمونه اضافه و پس از چندمرتبه اینورت کردن به مدت هفت دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از برداشت فاز آبی از ویال، حدود ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به ویال اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شده، پس از آن به مدت پنج دقیقه و با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ

نتایج آزمایش غربال (بر اساس ۸۰٪ وزن تر) توده FR3، مقاوم و توده S، حساس بود (نتایج نشان داده نشده‌اند). در این تحقیق میزان و نوع مکانیزم مقاومت توده FR3 با استفاده از آزمون دز-پاسخ و تیمار مالاتیون به شرح زیر تعیین شد. همچنین به منظور بررسی جهش در ژن ALS توالی‌یابی انجام شد.

آزمایش غربالگری و دز-پاسخ

ابتدا بذره‌های هر یک از توده‌های FR3 و S بعد از جوانه‌دارشدن به تعداد ۲۰ عدد به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۳۰ سانتیمتر با سه تکرار که حاوی پیت و پرلیت با نسبت ۳:۱ بودند منتقل و در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی فیروزآباد تا مرحله سه تا چهار برگی رشد کردند و در این مرحله به صورت زیر سمپاشی شدند. در قسمت اول آزمایش بوته‌های هر دو توده FR3 و S دو ساعت قبل از تیمار علف‌کش تری‌بنورون‌متیل با حشره‌کش مالاتیون (۱۰۰۰ گرم ماده موثره در هکتار) سمپاشی و سپس توده S با دزهای صفر، ۰/۶۳، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ و توده FR3 با دزهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ (گرم ماده موثره در هکتار) با استفاده از سمپاش با نازل متحرک تی‌جت ۸۰۰۴ و حجم محلول ۴۰۰ لیتر در هکتار و فشار ۲۰۰ kpa سمپاشی شدند و در قسمت دوم آزمایش، هر دو توده با دزهای علف‌کش فوق و بدون پیش تیمار مالاتیون سمپاشی شدند.

سه هفته پس از سمپاشی درصد بقای (LD_{50}) بوته‌های خردل وحشی اندازه‌گیری شد. LD_{50} با استفاده از نرم‌افزار Sigmaplot 12.0 توسط معادله سه پارامتره (معادله یک) غیر خطی لجستیکی زیر محاسبه شدند (Lu et al., 2023).

پیپت (قبل از اینکه بافر روی میکرونیدل کف کند)، بافر را به وسیله سمپلر برداشته و داخل ویال قرار داده که در این مرحله DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت.

توالی یابی ژن ALS با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی

با استفاده از نرم افزار Vector NTI و ترادف ژن ALS پرایمرهای مناسب برای تکثیر ژن ALS طراحی و ساخته شدند:

SARF-5'-CTA TCT CCT ACG TTA TGA GCC-3'

SARR-5'-TCG AGC TTT CCC GTG ACA CG-3'

قطعه‌های توالی یابی شده بالاترین درصد تشابه را (۹۸٪) با ژن‌های ALS (FJ655875.1) KNF2 و (FJ655877.1) MRS موجود در بانک ژن داشتند و بر اساس مقادیر جدول (۱) در دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه و ۳۵ سیکل، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه و چهار درجه سانتی گراد (توقف)، در PCR تکثیر شدند.

شد. در این مرحله ایزوپروپانول به آرامی از ویال خارج و محتویات ویال توسط اتانول ۷۰٪ شست و شو داده و پس از حذف اتانول مقدار ۲۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی اتوکلاو شده به ویال اضافه کرده و پس از چندبار پیپت، DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت.

ب) استخراج DNA از بافت برگ با استفاده از ورقه میکرونیدل بر پایه کیتوزان

طول نیدل‌ها به شکل هرم حدود ۲۵۰ میکرومتر و قاعده آنها ۳۰ میکرومتر به ابعاد ۱ x ۱ سانتی متر و تراکم تقریبی ۴۸۴ میکرونیدل بر سانتی متر مربع می‌باشد تا بتواند از لایه کوتیکول عبور کرده و به سلول‌های مزوفیل برگ وارد شود (میکرونیدل‌ها توخالی بوده و طول آن‌ها با توجه به نوع گیاه متفاوت خواهد بود) و محتویات سلول از جمله DNA را به مدت پنج دقیقه جذب می‌کند (Akbar & Begum, 2020).

پس از مدت مذکور، میکرونیدل از سطح برگ برداشته شده و توسط بافر TE (10mM Tris-HCl، 1mM EDTA، pH=8) به حجم ۵۰ میکرولیتر روی سطح میکرونیدل تزریق کرده و با دو تا سه بار انجام

جدول ۱- مواد مورد استفاده برای تکثیر ژن ALS در واکنش PCR.

Table 1. Materials used for amplification of the ALS gene in PCR reaction

مواد	مقدار
Master mix	7 μ l
F	1 μ l
R	1 μ l
Water	9 μ l
DNA	2 μ l
Total	20

(۲۰۱۹) و لی و همکاران (۲۰۲۲) می‌باشد (Jugulam & Shyam, 2019; Li et al., 2022).

استخراج DNA

پس از شناسایی توده مقاوم در مزرعه و آزمایش غربال اولیه، به دلیل اینکه بیشتر مکانیزم‌های مقاومت مبتنی بر جهش می‌باشند لذا جهت تعیین مکانیزم مقاومت، مبنای مولکولی مورد سنجش قرار گرفت. به منظور تشخیص جهش در نمونه مورد آزمایش، ابتدا استخراج DNA از بافت تازه برگ توده FR3 با استفاده از روش‌های CTAB و میکرونیل انجام شد. سپس تکثیر قطعه ۸۰۰bp توسط پرایمرهای SARF/SARR به‌خوبی انجام شد که در شکل ۲ قطعه تکثیرشده به روش‌های مختلف استخراج DNA مربوط به هر دو توده نشان داده شده است. باندهای تشکیل‌شده نشانگر کیفیت خوب DNA در هر دو روش استخراج می‌باشند.

بررسی تعیین توالی ژن ALS

توالی‌های ۸۰۰ و ۸۱۰ به‌دست‌آمده حاصل از توالی‌یابی ژن ALS، با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) با استفاده از برنامه بلاست (Blast/http://www.ncbi.org) مقایسه شدند.

پس از بلاست ژن‌های مربوط به توده‌های FR3 و S جهش نقطه‌ای شناسایی نشد (جدول ۳). بنابراین مقاومت توده FR3 مربوط به تغییر نوکلئوتیدهای ژن ALS نمی‌باشد. همچنین کیفیت فرم‌های مختلف آلل‌های هر دو توده بر کیفیت خوب استخراج DNA در هر دو روش دلالت دارد (شکل ۳) که با نتایج تحقیق راجش و همکاران، ۲۰۱۹ مطابقت داشت (Rajesh et al., 2019). همانطور که در

لازم به ذکر است مقادیر DNA استفاده‌شده در واکنش PCR، از روش CTAB و میکرونیل به‌طور یکسان و به مقدار دو میکرولیتر مطابق جدول استفاده شد. سپس از محصول PCR توده‌های FR3 و S هر کدام به مقدار ۲۰ میکرولیتر و جداگانه جهت تعیین توالی با روش سنگر به آزمایشگاه دنازیست ارسال شدند.

نتایج و بحث

آزمایش دز-پاسخ

برآزش توابع سه‌پارامتره لجستیکی و تعیین درجه مقاومت توده FR3 بر اساس درصد بقا (جدول ۲) و (شکل ۱) نشان داد که میزان مقاومت توده FR3 به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل، بدون پیش‌تیمار مالاتیون، ۲۳ برابر بیشتر از توده S (شاهد) بود؛ در-حالی‌که با پیش‌تیمار مالاتیون، واکنش توده FR3 مشابه توده S می‌باشد و درجه مقاومت این توده $LD_{50}=2/67$ و $RI=1/15$ درصد بقا مشابه توده حساس بوده است. بنابراین توده FR3 با پیش‌تیمار مالاتیون، نسبت به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل، ۲۰ برابر حساس‌تر از حالتی است که تیمار مالاتیون استفاده نشده است.

براساس یافته‌های مختلف، مالاتیون به‌عنوان بازدارنده آنزیم CYP450 شناخته شده است و در این تحقیق با کاربرد مالاتیون، علف‌کش تری‌بنورون‌متیل تجزیه‌نشده (به دلیل توقف فعالیت آنزیم CYP450) و مقاومت متابولیکی عامل عدم کارایی علف‌کش تری‌بنورون‌متیل در توده FR3 می‌باشد که مشابه نتایج تحقیقات جوگولام و شیام

کنترل نمایند. در آینده، آنزیم‌هایی که ژن با قابلیت جهش‌زایی کمتری داشته باشند به عنوان محل هدف علف‌کش در تحقیقات توسعه علف‌کش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Duke, 2012; Kraehmer, 2012; Gressel, 2020).

در نهایت با توجه به پژوهش انجام‌شده، استخراج DNA با استفاده از میکرونیدل می‌تواند به آسانی در مزارع با مقیاس وسیع جهت ارزیابی مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها توسط محققین و کشاورزان انجام گردد.

جدول (۳) مشاهده می‌شود توده‌های FR3 و S در نقاط ۱۷۵، ۱۷۸، ۱۸۱، ۲۱۲، ۲۴۸ و همچنین توده‌های فوق با آراییدوبسیس (*Arabidopsis thaliana*) با کد رفرنس AT3G48560 در نقاط ۱۶۷، ۱۷۸، ۱۸۸، ۴۷۵، ۵۸۶ و ۶۱۶ دارای جانشینی مترادف هستند که باعث تغییر اسیدآمینة نشده است؛ به همین دلیل تغییری در فعالیت آنزیم مشاهده نشده است.

در نهایت نتایج آزمایش حاضر بیانگر این است که استفاده از میکرونیدل از جنس کیتوزان می‌تواند در تشخیص سریع، صحیح و کم‌هزینه مکانیزم‌های بر مبنای جهش کاربرد داشته باشد. همچنین نتایج پیش‌تیمار مالاتیون نشان داد که توده مقاوم FR3 با درجه مقاومت بالا دارای مکانیزم مقاومت متابولسمی بوده و آنزیم CYP450 عامل ایجاد مقاومت در این توده می‌باشد.

با توجه به اهمیت مقاومت مبتنی بر متابولیسم به دلیل طیف وسیع مقاومت به انواع علف‌کش‌ها، لازم است مدیریت‌های غیر شیمیایی جهت کاهش تکامل مقاومت اعمال شوند. در برنامه جامع مدیریت شیمیایی علف‌های هرز، کاربرد علف‌کش‌های با مکانیسم عمل جدید می‌توانند ضمن کنترل جهش‌های موجود در جمعیت علف‌های هرز، روند تکامل مقاومت به علف‌کش را کاهش دهند (Murphy & Tranel, 2019). همچنین با شناسایی انواع جهش‌های غالب در مناطق مختلف، علف‌کش‌هایی ساخته و تجاری شوند که قادر باشند آنزیم دارای جهش خاص را در علف‌های هرز

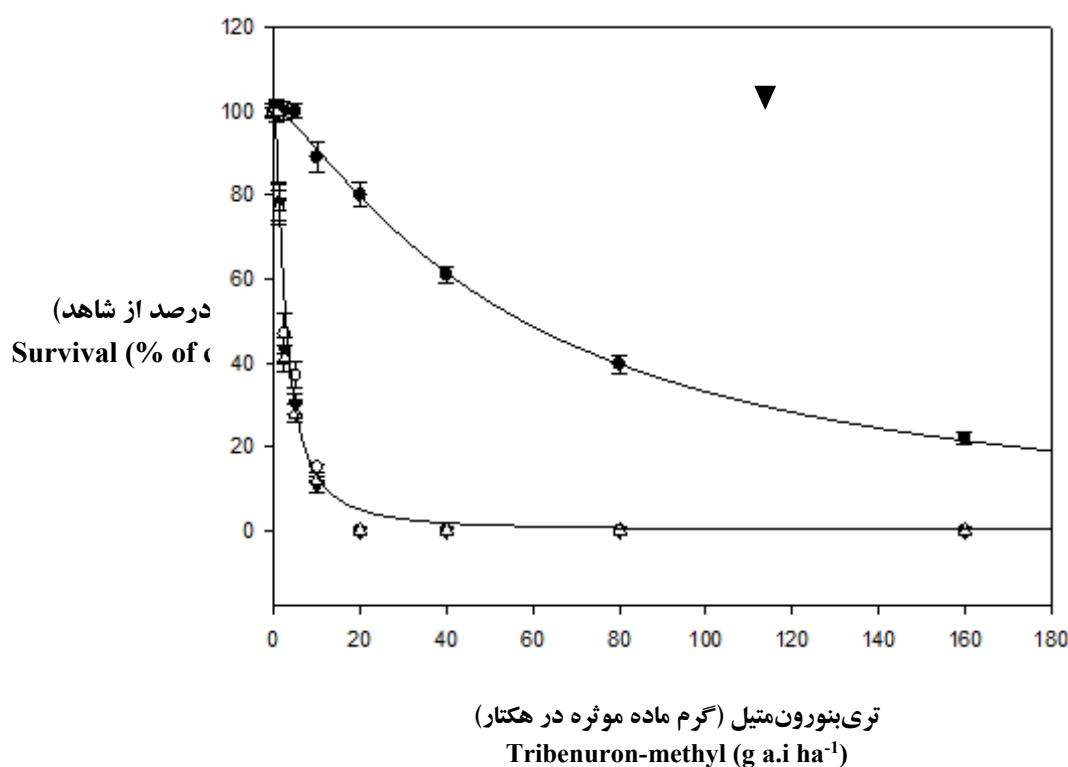
جدول ۲- میزان مقاومت از نظر درصد بقا (LD_{50}) به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل در توده مقاوم (FR3) و توده حساس (S) خردل وحشی با پیش‌تیمار مالاتیون و بدون پیش‌تیمار مالاتیون براساس پارامترهای حاصل از برازش معادله سه-پارامتره لجستیکی.

Table 2. Resistance of resistant (FR3) and susceptible (S) *Sinapis arvensis* populations to tribenuron-methyl with or without pretreatment of malathion, using a three-parameter log-logistic model based on LD_{50}

توده	a حد بالا	b شیب منحنی	LD_{50}	ضریب تبیین	درجه مقاومت (RI)
FR3 – (M)	100.32 (2.28)	1.42 (0.34)	53.5 (2.1)	0.99	23 ^a
FR3 + (M)	100.28 (4.7)	2.14 (0.28)	2.67 (1.8)	0.97	1.15 ^b
S + (M)	100.21 (3.2)	1.27 (0.27)	2.45 (4.38)	0.99	
S – (M)	99.1 (3.6)	2.4 (0.42)	2.33 (4.89)	0.98	

(+M) پیش‌تیمار مالاتیون، (–M) بدون استفاده از مالاتیون، درجه مقاومت (RI)، مقادیر خطای استاندارد در پرانتز. بر اساس آزمون t، توده مقاوم FR3 بدون پیش‌تیمار مالاتیون نشان داده شده با حرف (a) از نظر درجه مقاومت در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) دارای اختلاف معنی‌دار با توده FR3 با استفاده از مالاتیون می‌باشد.

(+M) Malathion pretreatment; (–M) without malathion pretreatment; Resistance Index (RI); standard error values are shown in parentheses. Based on the *t*-test, the resistant population FR3 without malathion pretreatment (indicated by the letter a) shows a significant difference in resistance level at the 1% probability level ($p \leq 0.01$) compared to the FR3 population treated with malathion.



شکل ۱- درصد بقاء توده‌های خردل وحشی (*S. arvensis*) مقاوم (FR3) و حساس (S) به علف‌کش تری‌بنورون‌متیل با پیش‌تیمار مالاتیون و بدون پیش‌تیمار مالاتیون بر اساس پارامترهای حاصل از برازش معادله سه-پارامتره لجستیکی بر اساس LD_{50} .

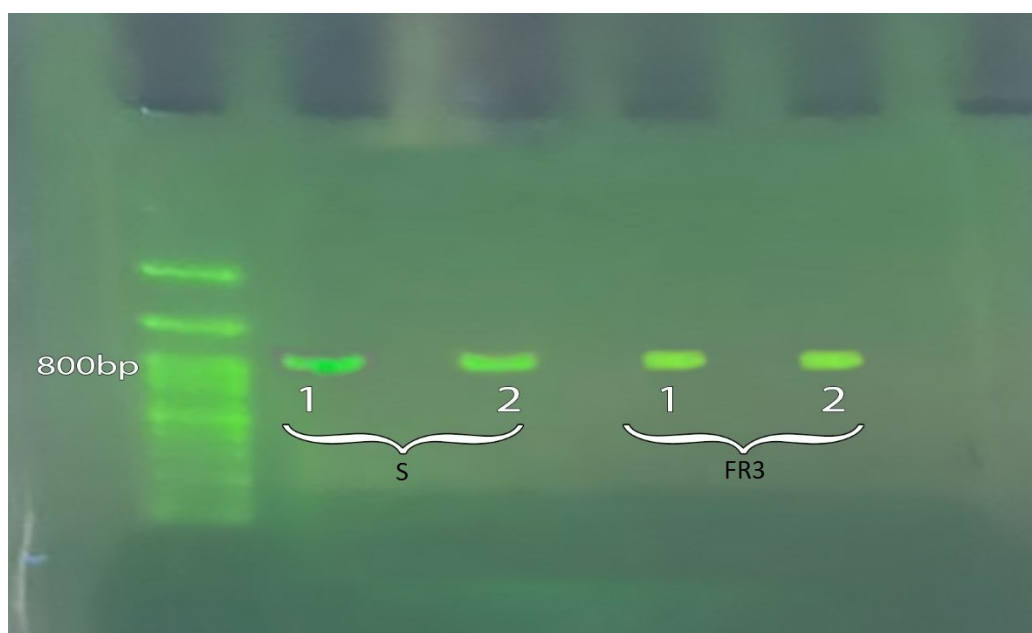
Figure 1. Percentage survival of resistant (FR3) and susceptible (S) *Sinapis arvensis* populations to tribenuron-methyl with or without malathion pretreatment, using a three-parameter log-logistic model based on LD_{50} .

جدول ۳- توالی نوکلئوتیدی ژن ALS در توده مقاوم (FR3) و توده حساس (S) در علف هرز خردل وحشی بر اساس توالی ژن آرابیدوپسیس.

Table 3. ALS nucleotide sequence in resistant (FR3) and susceptible (S) *Sinapis arvensis* populations, based on the *Arabidopsis thaliana* gene sequence.

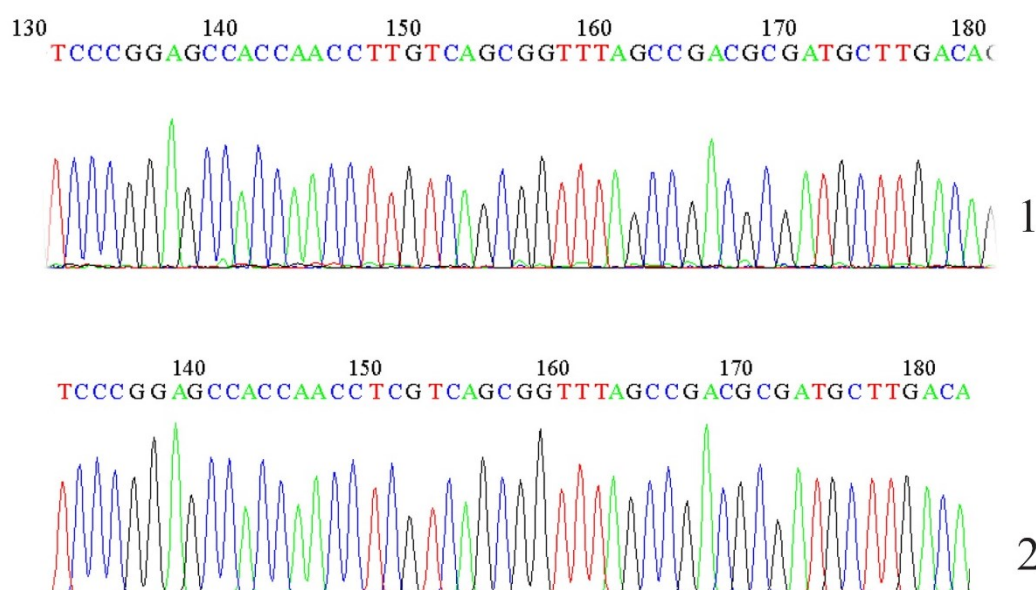
A	B	C	D	E	F
۱۳۳	FR3	TCT		Ser	TCT
	S	ACG			
۱۶۷	FR3	CTC		Thr	ACT
	S		CTT		
۱۷۵	FR3	GGT		Leu	CTC
	S				
۱۷۸	FR3	GGT		Gly	GGA
	S		GGC		
۱۸۱	FR3		GAC	Asp	GAT
	S	GAT			
۱۸۸	FR3	CCC		Pro	CCT
	S				
۱۹۳	FR3	ACA		Thr	ACA
	S				
۱۹۷	FR3	CCC		Pro	CCC
	S				
۲۱۲	FR3	GTT		Val	GTT
	S		GTC		
۲۴۸	FR3	GGA		Gly	GGA
	S		GGG		
۲۵۱	FR3	TTG		Leu	TTG
	S				
۲۹۰	FR3	GAC		Glu	GAC
	S				
۳۲۹	FR3	GCG		Ala	GcG
	S				
۳۶۱	FR3	GTG		Val	GTG
	S				
۳۷۶	FR3	GAC		Asp	GAC
	S				
۳۷۹	FR3	ACG		Thr	ACG
	S				
۴۲۸	FR3	ACC		Asn	AAC
	S				
۴۷۵	FR3	ACG		Thr	ACT
	S				
۵۷۴	FR3	TGG		Trp	TGG
	S				
۵۷۷	FR3	GGG		Arg	GGG
	S				
۵۸۶	FR3	ACG		Thr	ACA
	S				
۶۱۶	FR3	ACG		Thr	ACA
	S				

A: نقاطی روی ژن بر اساس کد ژن رفرنس که تاکنون به علت جهش نقطه‌ای مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ALS گزارش شده است. B: توده FR3 و توده S، C: توالی نوکلئوتیدها، D: تغییر نوکلئوتید در توده که باعث تغییر اسید آمینه نمی‌شود (جانشینی مترادف)، E: اسیدهای آمینه، F: توالی نوکلئوتید آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به عنوان گیاه مرجع و حساس به علف‌کش‌های بازدارنده ALS، بر اساس کد رفرنس AT3G48560.



شکل ۲- نتیجه آزمایش PCR در توده مقاوم (FR3) و توده حساس (S) خردل وحشی و تشکیل باند 800 جفت‌بازدر هر دو روش استخراج DNA به روش CTAB و استفاده از میکرونیدل کیتوزان.

Figure 2. PCR amplification of DNA extracted using microneedle and CTAB methods, showing the characteristic 800 bp band in resistant (FR3) and susceptible (S) *Sinapis arvensis* populations.



شکل ۳- کروماتوگرام آلل‌های ژن ALS در توده مقاوم FR3 با روش‌های استخراج DNA شامل روش ۱ (CTAB) و روش ۲ (کیتوزان).

Figure 3. Chromatogram of ALS gene alleles in the resistant FR3 *Sinapis arvensis* population using DNA extraction methods, including method 1 (CTAB) and method 2 (microneedle).

منابع

- Aboul-Muaty, N.A.F. and Oraby, H.A.S. 2019. Extraction of high – quality different plant orders applying a modified CTAB – based method. Bull. Natl. Res. Cent. 43: 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>.
- Akbar, F. and Begum, K.N. 2020. A comparative anatomical investigation of three taxa of *Brassica* L. from Bangladesh. Plant Taxon. 27(1): 15-26.
- Axhgar, M. Bagheri, A. Nosratti, I. and Broomandan, P. 2022. Tracing resistance of wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) to tribenuron methyl and evaluation of relative fitness of its susceptible and resistant ecotypes in Eslamabad-Gharb, Kermanshah. IJWS. DOI: 10.22092/IJWS. 2022.359236.1415.
- Bahmani Fathabadi, A. Zand, E. Masumi, M. Naderi, A. and Lack, S. 2016. Evaluation of resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicide in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.). J. Exp. Biol. Agric. 4: 581-587. DOI: <http://dx.doi.org/10/18006/2016>.
- Campos, C.A. Gerschenson, L.N. and Flores, S.K. 2010. Development of edible films and cookings with. Antimicrobial activity. Food BioProcess Technol. 4: 849-875.
- Duke, S.O. 2012. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? Pest Manag. Sci. 68: 505-512.
- Evans, J.A. Tranel, P.J. Hager, A.G. Schutte, B. Wu, C. and Chatham, L.A. 2016. Managing the evolution of herbicide resistance. Pest Manag. Sci. 72: 74-80.
- Gaines, T.A. Duke, S.O. Morran, S. Rigon, C.A.G. Tranel, P.J. Kupper, A. and Dayan, F.E. 2020. Mechanisms of evolved herbicide resistance. J. Biol. Chem. 295: 10307-10330.
- Gianessi, L.P. 2013. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. Pest Manag. Sci. 47: 1099–1105.
- Gressel, J. 2020. Perspective: Present pesticide discovery paradigms promote the evolution of resistance-learn from nature and prioritize multi-target site inhibitor design. Pest Manag. Sci. 76: 421-80.425.
- Haghnama, K. and Mennan, H. 2020. Herbicide resistant barnyardgrass in Iran and Turkey. Planta Deninha. <https://doi.Org/10.1590/s0100-83582020380100060>.
- Heap, I. 2024. The international survey of herbicide resistant weeds. www.weedscience.org.
- Jugulam, M. and Shyam, C. 2019. Non-target-site resistance to herbicides: Recent Developments. Plants, 8, 417-422.
- Kong, M. Chen, X.G. Xing, K. and Park, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. Int. J. of Food Microbiol. 144: 51-63.
- Kraehmer, H. 2012. Innovation: Changing trends in herbicide discovery. Outlooks Pest Manag. 23: 115-118.
- Lamberth, C. Jeanmart, S. Lukseh, T. and Plant, A. 2013. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. Science. 341: 742–746
- Li, Z. Liu, H. Wang, J. Chen, W. Bai, L. and Pan, L. 2022. Enhanced metabolism evolved high-level resistance to fenoxaprop-p-ethyl in *Alopecurus japonicus*. Agron. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092172>.
- Lu, H. Liu, Y. Bu, D. Yang, F. Zhang, Z. and Qiang, S. 2023. A double mutation in the ALS gene confers a high level of resistance to mesosulfuron- methyl Sheferd/s- purse. Plants. <https://doi.Org/10.3390/plants12142730>.
- Mallory-Smith, C.A. and Sanchez Olgin, E. 2011. Gene flow from hearbicide – resistant crops: It's not just for transgenes. J. Agric. Food Chem. 59: 5813–5818.
- Mazur, B.J. and Falco, S.C. 1989. The development of herbicide resistant crops. Annu. R.V. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 40: 441-470.
- Murphy, B.P. and Tranel, P.J. 2019. Target-site mutation conferring herbicide resistance. Plants. 8: 382-397.

- Nosrati, I. and Muhammadyari, A. 2018. First report of multiple resistance in *Galium aparine* to ALS – inhibiting and auxin analog herbicides in Kermanshah, Iran. *Planta Daninha*. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582019370100084>.
- Ostermann, P.R. Ristaino, G.Z. and Wei, Q. 2020. DNA extraction from plant leaves using a microneedle patch. *Current Protocols in Plant Biol.* 5: e20104. Doi: 10.1002/cppb.20104.
- Rajesh, P. Saville, A.C. Hansel, J.C. Ye, Y. Ball, C. Williams, A. Chang, X. Zhen, G.U.G.C. Ristaino, J.B. and Wei, Q. 2019. Extraction of plant DNA by microneedle patch for rapid detection of plant diseases. *American Chem. Soc.* DOI: 10.1021/acsnano.9b00193.
- Sasanfar, H. Zand, E. Zamani, M.H. Keshtkar, E. and Joumi, A. 2021. Resistance of the problematic grass weeds to some commonly used herbicides in canola (*Brassica napus* L.) fields in three provinces of Iran. *IJWS*. 17(2): 79 – 98.
- Selz, J. Adam, N.R. Magrini, C.E.M. Montandon, F.M. Buerki, S. and Maerkl, S.J. 2023. A field-capable rapid plant DNA extraction protocol using microneedle patches for botanical surveying and monitoring. *Appl. Plant Sci.* <https://doi.org/10.1002/aps.3.11529>.
- Sharma, A. Kumar, V. Shahzad, B. Tanveer, M. Sidhu, G.P.S. Handa, N. *et al.* 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1: 1-16.
- Tahmasebi, B.K. Zand, E. Yousefi, A. Babaei, S. and Sadeghpour, A. 2024. Surveillance and mapping of tribenuron- methyl- resistant weeds in wheat fields. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41589-024-75308-1>.
- Tranel, P.J. Wright, T.R. and Heap, I. 2019. Mutation in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Available online at: <http://www.weedscience>.
- Trout, C.L. Ristaine, J.B. Madritch, M. and Wang Somboondee, T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora* infestans in late blight-infested potato and tomato using PCR. *Plant Dis.* 81: 1042-1048.
- Yu, Q. and Powles, S.B. 2014. Metabolism – based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiol.* 166: 1106–1118.