



Original Article

Simultaneous Occurrence of Two Proline-197-Threonine (Pro-197-Thr) and Tryptophan-574-Leucine (Trp-574-Leu) Mutations Associated with Resistance to Iodosulfuron-Methyl-Sodium+Mesosulfuron-Methyl in Annual Ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin)

Sanaz Hanifehzadeh Erdi¹, Mohammad Taghi Alebrahim^{2*}, Eskandar Zand³,
Hamidreza Sasanfar³, Motahharez Mohsenpour⁴

1. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: m_ebrahim@uma.ac.ir
3. Weed Research Department, Institute of Plant Medicine Research, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
4. Genetic Engineering and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Article Info

Received:

February 15, 2024

Accepted:

May 14, 2024

First published online:

June 21, 2024

Corresponding Author:

Mohammad Taghi
Alebrahim

Email:

m_ebrahim@uma.ac.ir

Key words: ALS inhibitor, herbicide resistance, resistance mechanism, sequencing, target-site resistance.

Abstract

The present study aimed to investigate the probability of mutation occurrence at the target site of acetolactate synthase (ALS) inhibitors in annual ryegrass. For this purpose, annual ryegrass seeds were collected from a wheat field in Golestan province, where the occurrence of resistance had been reported. A whole-plant assay was conducted in a greenhouse using the recommended rate (1.5 L ha⁻¹) of the herbicide iodosulfuron-methyl-sodium+mesosulfuron-methyl (Atlantis, OD 1.2%). Four weeks after treatment, samples were collected to evaluate the resistance ratio and study the molecular resistance mechanism at the target site. DNA extraction, amplification, and purification of the ALS gene from the total genomic DNA of the L183 population were performed using PCR and electrophoresis. The excised gel fragment containing the ALS gene was sent for sequencing to facilitate further molecular investigations. The results indicated that the L183 annual ryegrass population, with a survival rate of 89.29%, a dry weight percentage of 86.22%, and a fresh weight reduction of 9.28% compared to the untreated control, was highly resistant (RRR) to iodosulfuron-methyl-sodium+mesosulfuron-methyl. Molecular sequencing of the ALS gene in the L183 ryegrass population, compared to the reference ALS gene of *Arabidopsis*, revealed the potential simultaneous presence of two mutations. These involved the substitution of proline with threonine at codon 197 (Pro-197-Thr) and the substitution of tryptophan with leucine at codon 574 (Trp-574-Leu). These mutations were identified in the bidirectional sequencing of the ALS gene in the L183 annual ryegrass population from Golestan province, and these alleles are likely responsible for resistance. Based on the screening and sequencing results, the occurrence of known two known point mutations, Pro-197-Thr and Trp-574-Leu, in the ALS gene of the L183 annual ryegrass population led to changes in the amino acids of the target protein. These nucleotide alterations caused reduced effectiveness of the herbicide iodosulfuron-methyl-sodium+mesosulfuron-methyl and the emergence of resistance.

Cite this article: Hanifehzadeh Erdi, S. Alebrahim, M.T. Zand, E. Sasanfar, H.R. and Mohsenpour, M. (2024). Simultaneous occurrence of two proline-197-threonine (Pro-197-Thr) and tryptophan-574-leucine (Trp-574-Leu) mutations associated with resistance to iodosulfuron-methyl-sodium+mesosulfuron-methyl in annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin). Iran. J. of Weed Sci. 20(1): 147-164. DOI: 10.22034/ijws.2025.368117.1479.



مقاله پژوهشی

وقوع هم‌زمان دو جهش پرولین-۱۹۷-ترئونین (Pro-197-Thr) و تریپتوفان-۵۷۴-لوسین (Trp-574-Leu) مرتبط با مقاومت به علف کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل در علف هرز چچم یکساله (*Lolium rigidum* Guadin)

ساناز حنیفه‌زاده اردی^۱، محمد تقی آل ابراهیم^{۲*}، اسکندر زند^۳، حمیدرضا ساسان‌فر^۴، مطهره محسن‌پور^۵

- ۱- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
- ۲- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: m_brahim@uma.ac.ir
- ۳- بخش تحقیقات علف‌های هرز، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
- ۴- بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

پژوهش حاضر با هدف بررسی مولکولی احتمال وقوع جهش‌های مبتنی بر محل هدف به بازدارنده‌های استولاکتات-سینتاز (ALS) در چچم انجام شد. بدین منظور، بذور علف هرز چچم از مزرعه گندم استان گلستان که احتمال بروز مقاومت در آن‌ها گزارش شده بود، جمع‌آوری و آزمایش زیست‌سنجی در گلخانه با غلظت توصیه‌شده (۱/۵ لیتر در هکتار) علف کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل (آتلانتیس، OD ۱/۲ درصد) انجام شد. چهار هفته پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری برای ارزیابی رتبه مقاومت و استخراج DNA، به منظور بررسی مکانیزم مقاومت مبتنی بر محل هدف انجام شد. پس از استخراج DNA، تکثیر و خالص‌سازی ژن ALS از کل DNA ژنومی توده چچم L183، با استفاده از PCR و الکتروفورز صورت گرفت. قطعه ژل برش داده‌شده، محتوی ژن ALS، به منظور بررسی-های مولکولی بیشتر برای توالی‌یابی ارسال شد. نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که توده چچم L183 با میزان زنده‌مانی ۸۹/۲۹ درصد، وزن خشک ۸۶/۲۲ درصد و کاهش وزن تر ۹/۲۸ درصد در مقایسه با شاهد بدون سم‌پاشی، در رتبه بسیار مقاوم (RRR) قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی مولکولی ژن ALS توده چچم نیز در مقایسه با ژن ALS آراییدوپسیس (مرجع) نشان داد که احتمال وجود هم‌زمان دو جهش متناظر در جایگزینی اسیدآمینه پرولین در کدون ۱۹۷ به اسیدآمینه ترئونین (Pro-197-Thr) و اسیدآمینه تریپتوفان در کدون ۵۷۴ به اسیدآمینه لوسین (Trp-574-Leu) در خوانش دو جهت ژن ALS توده چچم L183 استان گلستان وجود داشت که این آلال‌ها می‌توانند مقاومت به علف کش را در پی داشته باشد. با توجه به نتایج آزمایش غربال‌گری و توالی‌یابی، وقوع دو جهش نقطه‌ای شناخته‌شده Pro-197-Thr و Trp-574-Leu، در ژن ALS توده چچم L183، منجر به تغییر اسیدهای آمینه پروتئین محل هدف در ژن ALS، به واسطه تغییر در نوکلئوتیدها، موجب عدم تأثیر علف کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل و بروز مقاومت شده است.

تاریخ دریافت:

۱۴۰۲/۱۱/۲۶

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۳/۰۲/۲۵

تاریخ انتشار برخط:

۱۴۰۳/۰۴/۰۱

نویسنده مسئول:

محمد تقی آل ابراهیم

ایمیل:

m_brahim@uma.ac.ir

واژه‌های کلیدی:

بازدارنده ALS، توالی‌یابی، مقاومت به علف کش، مقاومت محل هدف، مکانیزم مقاومت.

استناد: حنیفه‌زاده اردی، س. آل ابراهیم، م. ت. زند، ا. ساسان‌فر، ح. ر. و محسن‌پور، م. (۱۴۰۳). وقوع هم‌زمان دو جهش پرولین-۱۹۷-ترئونین (Pro-197-Thr) و تریپتوفان-۵۷۴-لوسین (Trp-574-Leu) مرتبط با مقاومت به علف کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل در علف هرز چچم (*Lolium rigidum* Guadin). دانش علف‌های هرز ایران، ۲۰(۱): ۱۶۷-۱۶۴. Doi: 10.22034/ijws.2025.368117.1479.

ناشر: انجمن علوم علف‌های هرز ایران و مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

© نویسندگان.

مقدمه

همواره گندم به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات زراعتی از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید در جهان مطرح بوده و نقش مهمی را در تأمین نیاز غذایی جوامع بشری ایفا می‌کند (Joudi & Ebadi, 2014). بر اساس گزارش دهقان‌بنادکی (Dehghan Banadaki, 2018) میانگین کاهش عملکرد ناشی از رقابت علف‌های هرز در مزارع گندم ایران حدود ۲۳ درصد گزارش شده است. بنا به گزارش آن‌ها مقدار خسارت در استان‌های مختلف کشور با بررسی ۵۰۰۰ نمونه از مزارع گندم آبی استان‌ها و اقلیم‌های مختلف کشور نشان می‌دهد که خسارت علف‌های هرز در اقلیم‌های سرد مانند کرمانشاه ۲۷ درصد، در اقلیم معتدل مانند تهران ۱۷ درصد، در اقلیم گرم مانند خوزستان ۲۳ درصد و در اقلیم خزری مانند استان گلستان ۲۸ درصد گزارش شده است. مین‌باشی و همکاران (Minbashi et al., 2015) علف‌های هرز مزارع گندم آبی کشور را ۴۰۰ گونه ذکر کردند که بسته به استان و شرایط اقلیمی، تراکم و حضور آن‌ها می‌تواند متفاوت باشد. طبق گزارش ایشان گونه‌های هفت‌بند (*Polygonum aviculare* L.) خردل وحشی (*Sinapis arvensis* O.F. Müll.) از مک (*Cardaria draba* Desv.) بی‌تی‌راخ (*Galium tricornatum* L.) تلخه (*Acroptilon repense* (L.) DC.) خاکشیر (*Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl)

خاکشیر تلخ (*Erysimum odoratum* Ehrh.) گل-گندم (*Centaurea depressa* L.) آناگالیس (*Anagallis arvensis* L.) پنیرک (*Malva sylvestris* L.) ماشک (*Vicia assyriaca* Boiss.) شلمی (*Rapistrum rogosum*) خلر وحشی (*Lathyrus sativus* L.) به ترتیب مهم‌ترین علف‌های هرز پهن‌برگ مزارع گندم هستند. از طرفی، یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Durieu) خونی‌واش کوچک (*Phalaris minor* Retz.) جودره (*Hordeum spontaneum* K.Koch) جو وحشی (*Hordeum murinum*) علف‌پشمکی، چاودار (*Secale cereale* L.) و چچم (*Lolium rigidum* Gaudin) را مهم‌ترین علف‌های هرز کشیده‌برگ مزارع گندم آبی کشور عنوان کردند. طبق گزارش ممنوعی و همکاران (Mamnoie et al., 2023)، چچم گیاهی تک‌لپه، یک‌ساله، علفی، از تیره گندمیان و یکی از مهم‌ترین گونه‌های خسارت‌زا در گندم و جو به‌ویژه در مناطق جنوبی ایران و استان فارس است و مقدار خسارت آن بسته به شدت آلودگی تا ۷۰ درصد نیز گزارش شده است. همچنین پژوهشگران (Zand et al., 2010) در گزارش دیگری اذعان داشتند که چچم (*Lolium spp.*) از جمله مهم‌ترین علف‌های هرز کشیده‌برگ مزارع گندم ایران محسوب می‌شود و استان‌های خوزستان، فارس، سمنان و سیستان و بلوچستان از نظر آلودگی به این

علف هرز از اهمیت بیشتری برخوردارند. به‌طور کلی، علف‌های هرز باریک‌برگ از جمله چچم به دلیل شباهت مورفولوژیکی، نیازهای رشدی یکسان و رقابت بر سر منابع، باعث کاهش عملکرد گندم می‌شوند. چچم یک‌ساله را می‌توان در پایان مرحله سه‌برگی تا اواسط پنجه‌زنی گندم با استفاده از برخی از علف‌کش‌های ثبت‌شده در ایران از جمله بازدارنده‌های ALS کنترل کرد، اما استفاده متوالی از علف‌کش‌های بازدارنده‌ی ALS باعث بروز مقاومت به این علف‌کش‌ها می‌شود (Zand et al., 2007).

علف‌کش‌های سولفونیل‌اوره، مهارکننده آنزیم استولاکتات‌سنتاز (ALS) و استوهیدروکسی‌اسید-سنتاز (AHAS) هستند که یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ایزولوسین، لوسین و والین که اسیدهای آمینه شاخه‌داری هستند مصرف کم و سمیت (Duggleby et al., 2008). پایین برای انسان، دوزمنظوره‌بودن (کنترل توام علف-های هرز باریک‌برگ و پهن‌برگ) و خاصیت انتخابی مناسب علف‌کش‌های بازدارنده ALS، مصرف آن‌ها در جهان را افزایش داده و بروز مقاومت به این علف‌کش‌ها در علف‌های هرز را سرعت بخشیده است (Heap, 2006). طبق گزارش هیپ (Heap, 2016)، در سطح جهان ۵۳۳ مورد علف هرز مقاوم به علف‌کش، متعلق به ۲۷۳ گونه علف هرز، گزارش شده است. طبق این گزارش علف‌های هرز نسبت به ۲۱ محل عمل شناخته‌شده علف‌کش و تعداد ۱۶۸ علف‌کش مختلف مقاومت نشان داده‌اند.

همچنین طبق گزارش آن‌ها مهارکننده‌های ALS (با گزارش ۱۷۵ گونه مقاوم) بیشتر مستعد بروز مقاومت بوده‌اند. اولین علف‌کش بازدارنده ALS در سال ۱۹۸۲ جنبه تجاری پیدا کرد و اولین مورد مقاومت به بازدارنده‌های ALS در سال ۱۹۸۷ یعنی فقط پنج سال پس از معرفی کلروسولفورون در علف هرز کاهوی وحشی (*Lactuca serriola*) مشاهده شد (Mallory-Smith et al., 1990). طبق گزارش هیپ (Heap, 2024) برای اولین بار در جهان، مقاومت در گونه‌های چچم به علف‌کش بازدارنده استیل‌کوآنزیم‌آکربوکسیلاز (ACCase)، در سال ۱۹۸۷ گزارش شد. همچنین وی گزارش کرد که مقاومت چچم به علف‌کش‌های بازدارنده ALS برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ در ایالت متحده ثبت شد. در استرالیا نیز علف هرز چچم در اغلب مزارع کشاورزی وجود داشته و اولین مقاومت علف‌کشی در چچم، در سال ۱۹۸۲ گزارش شد (Heap & Knight, 1982).

در اروپا اولین گزارش مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده استولاکتات‌سنتاز در سال ۱۹۹۱ در انگلستان و سپس در سایر کشورهای شمال اروپا در دم‌روباهی کشیده (*Alopecurus myosuroides*) بود (Thill & Lemerle, 2001). در سال ۱۹۹۸ در ایالت ایلینویز توده‌های بسیار زیادی از تاج‌خروس (*Amaranthus ruders* و *A. tuberculatus*) مقاوم به بازدارنده‌های ALS شناخته شدند؛ به‌طوری‌که دیگر در این منطقه برای کنترل تاج‌خروس علف‌کش‌های بازدارنده ALS توصیه نمی‌شود (Patzoldt et al., 2002). در ایالت آلبرتا در مزارع تحت کشت گیاهان یک‌ساله، به‌ترتیب ۳۹ و ۱۲

درصد مقاومت به بازدارندگان ACCase و ALS در یولاف وحشی گزارش شده است که مساحت تقریبی ۱/۶ میلیون هکتار را شامل می‌شود (Beckie et al., 2009). در ایران نیز نتایج پژوهش زمانی و همکاران حاکی از مقاومت عرضی و چندگانه در ۶۷ درصد از نه توده چچم مورد بررسی به علف‌کش‌های مزوسولفورون + یدوسولفورون (آتلانتیس)، کلودینافوپ پروپارژیل (تاپیک) و مزوسولفورون + یدوسولفورون + دیفلوفنیکان (آتللو) بود (Zamani et al., 2019). همچنین طی یک گزارش ساسانفر و همکاران (Sasanfar et al., 2024) مقاومت ۸۲ درصد از ۱۱ توده‌ی چچم یک‌ساله به دو گروه از علف‌کش‌های بازدارنده ACCase و ALS در مزارع گندم را تأیید نمودند. توسلی و همکاران نیز با بررسی ۸۲ بیوتیپ، ضمن تأیید مقاومت توده‌های چچم استان گلستان، فراوانی بالای توده‌های مقاوم چچم در این استان را به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase نظیر کلودینافوپ- پروپارژیل در مزارع گندم نسبت دادند (Tavasoli et al., 2021).

همچنین در آزمایشی کاربرد علف‌کش مزوسولفورون + یدوسولفورون (آتلانتیس) به میزان ۱/۵ لیتر در هکتار در مزارع گندم استان خوزستان به خوبی علف‌هرز چچم را کنترل نکرد (بین ۱۵ تا ۴۵ درصد) و کنترل آن ضعیف ارزیابی شد، در نتیجه مشخص شد که علف‌هرز چچم به این علف‌کش مقاومت نشان داده است (Sabet Zangeneh & Zangeneh, 2021).

در ارزیابی مقاومت به علف‌کش‌ها زمان لازم جهت تعیین بروز مقاومت در توده‌ها از جنبه مدیریت مقاومت بسیار مهم است (Moss et al., 1995; Beckie et al., 2000). بر این اساس محققان مختلفی در سراسر دنیا به دنبال روش‌های ارزیابی سریع‌تر مقاومت بوده و در این راستا روش‌هایی نظیر آزمایش‌های پتری‌دیش، جوانه‌زنی دانه گرده، سنجش آنزیمی و روش‌های مولکولی ابداع و مورد استفاده قرار گرفته است (Beckie et al., 2000). بنا به گزارش گینز و همکاران (Gaines et al., 2020) مکانیسم‌های مقاومت به دو دسته مکانیسم مبتنی بر محل هدف و مکانیسم مبتنی بر غیر محل هدف تقسیم می‌شوند که هر دو نوع مکانیسم مقاومت در خانواده‌های مهم علف‌کشی گسترش یافته‌اند. طبق گزارش ایشان مکانیسم مقاومت مبتنی بر محل هدف، اغلب شامل جهش در ژن‌هایی است که اهداف پروتئینی علف‌کش‌ها را کد می‌کنند که بر نواحی اتصال علف‌کش تأثیر می‌گذارد. همچنین مکانیسم مقاومت مبتنی بر غیر محل هدف نیز شامل کاهش جذب یا انتقال و محوس نمودن علف‌کش در یک مکان از سلول و افزایش متابولیسم علف‌کش به ترکیبات سمی کمتر است. از طرفی محققان عامل اصلی مقاومت به علف‌کش‌های مهارکننده ALS را تغییر محل‌های هدف می‌دانند (Tranel & Wright, 2002). همچنین یوان و همکاران (Yuan et al., 2007) عنوان کردند که استفاده مکرر از دزهای بالای یک علف‌کش باعث افزایش مقاومت از طریق مکانیزم مقاومت مبتنی بر

(Ala-205-Phe, Val) آسپارتیک در موقعیت ۳۷۶ (Asp-376-Glu)، آرژنین در موقعیت ۳۷۷ (Arg-377-His)، تریپتوفان در موقعیت ۵۷۴ (Trp-574-Gly, Leu, Met)، سرین در موقعیت ۶۵۳ (Ser-653-Asn, Ile, Thr) و گلیسین در موقعیت ۶۵۴ (Gly-654-Asp, Glu) جهش‌های گزارش شده ژن ALS هستند که می‌توانند منجر به بروز مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ALS شوند (Powles & Yu, 2014; Tranel *et al.*, 2016). غنی‌زاده و همکاران (Ghanizadeh *et al.*, 2022) با گزارش مقاومت به علف‌کش یدوسولفورون، از بازدارنده‌های آنزیم استولاکتات سنتاز (ALS)، در جمعیت چچم، اولین گزارش در مورد مقاومت محل هدف به علف‌کش‌های بازدارنده ALS در چچم نیوزیلند را ارائه دادند.

در غالب موارد انتخاب روش کنترل شیمیایی برای مهار علف هرز چچم و به دنبال آن مصرف متوالی علف‌کش‌های بازدارنده ALS در مزارع گندم کشور موجب گزارش‌هایی از عدم تأثیرگذاری علف‌کش‌های خانواده ALS شده است. لذا در این پژوهش با مطالعات مزرعه‌ای و جمع‌آوری بذوری با گزارش مقاومت به علف‌کش مزوسولفورون+یدوسولفورون (آتلانتیس، ۱/۲ OD درصد) از یک مزرعه گندم از استان گلستان، سعی شد تا دلایل عدم تأثیر علف‌کش آتلانتیس را روی گونه چچم، مورد بررسی قرار داده و در ادامه با ارزیابی مولکولی مکانیزم احتمالی بروز مقاومت در آزمایشگاه، دلایل عدم تأثیرگذاری علف‌کش آتلانتیس مشخص گردد.

محل هدف می‌شود. تکنیک استخراج CAPS (d) نیز به طور موفقیت آمیزی برای آشکار ساختن جهش‌های منجر به مقاومت در ژن‌های ALS به کار رفته است (De'lye *et al.*, 2011; De'lye & Boucansaud, 2008; Kaundun & Windass, 2006).

از طرفی، علاوه بر جهش‌های نقطه‌ای در محل هدف که می‌تواند منجر به مقاومت عرضی شود، مقاومت به این گروه از علف‌کش‌ها می‌تواند بر اساس متابولیسم نیز باشد (Hidayat & Preston, 2001). از آنجایی که اکثر علف‌کش‌ها به طور اختصاصی آنزیم‌ها را در متابولیسم گیاهان مهار می‌کنند، مشخص کردن ژن‌های کدکننده بسیار مهم هستند (Powles & Yu, 2010). همچنین پروتئین‌های سیتوکروم مونواکسیژناز (P450) نیز می‌توانند علف‌کش‌های ALS را متابولیزه کرده و میزان علف‌کشی که به محل اثر می‌رسند را کاهش دهند (Iwakami *et al.*, 2013). به عبارت دیگر، آنزیم‌های سیتوکروم P450 مونواکسیژناز (P450s) نقش مهمی در متابولیسم علف‌کش‌ها دارند (Alebrahim *et al.*, 2021).

بنا به گزارش مالوری اسمیت و نموس (Mallory-Smith & Namuth, 2006) جهش‌های محل هدف در علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش‌های بازدارنده استولاکتات سنتاز شناسایی شده‌اند. به طور کلی، جایگزینی آلانین در موقعیت ۱۲۲ (Ala-122-Thr, Tyr, Val)، پرولین در موقعیت ۱۹۷ (Pro-197-Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Tyr) آلانین در موقعیت ۲۰۵

مواد و روش‌ها

بذور چچم L183 در بهار سال ۹۷ از مزرعه گندم استان گلستان که سابقه مصرف متوالی علف‌کش‌های بازدارنده ALS داشته و کشاورزان گزارش‌هایی از احتمال مقاومت به این علف‌کش‌ها را ارائه داده بودند، جمع‌آوری شد. پژوهش شامل آزمایش‌های گلخانه‌ای، استخراج DNA، انجام آزمایش‌های PCR و توالی‌یابی بود. پژوهش‌های گلخانه‌ای در بخش تحقیقات علف‌های هرز، موسسه گیاه‌پزشکی کشور و آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. آزمایش زیست‌سنجی با گیاه کامل در گلدان با دز توصیه‌شده (۱/۵ لیتر در هکتار) علف‌کش مزوسولفورون+یدوسولفورون (آتلانتیس، OD 1.2%) و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. به‌منظور غربال گیاهچه‌ها در گلخانه و بررسی مقاومت در بین توده‌های چچم، به‌دلیل عدم وجود خواب در بذور چچم مستقیماً، تعداد هفت بذر در هر گلدان پلاستیکی که با خاک مزرعه، شن و کود دامی با نسبت یک:یک:یک ضد عفونی و پر شده بودند، کشت شد. گلدان‌ها به گلخانه با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۰ درجه سانتی-گراد و هشت ساعت تاریکی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و بر اساس نیاز، روزانه تا حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند.

به‌منظور بررسی مقاومت به علف‌کش مزوسولفورون + یدوسولفورون (آتلانتیس، OD ۱/۲ درصد)، سم‌پاشی با غلظت توصیه‌شده

(۱/۵ لیتر در هکتار) علف‌کش در مرحله دو تا سه برگی علف هرز، توسط دستگاه سم‌پاش با نازل متحرک بادبزن یکنواخت با حجم پاشش ۱۵۰ لیتر در هکتار و فشار ۲/۸ بار انجام شد. پس از گذشت چهار هفته از سم‌پاشی درصد وزن تر و خشک و زنده‌مانی گیاهان در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری و جهت ارزیابی وضعیت مقاومت بر اساس روش ادکینز و همکاران (Adkins et al., 1997) و ماس و همکاران (Moss et al., 2007) استفاده شد. جهت انجام آزمایش‌های مولکولی و استخراج DNA، بعد از تیمار، از بوته‌هایی که نسبت به علف‌کش از خود مقاومت نشان دادند، نمونه‌برداری از بافت‌های تازه، تمیز و زنده برگ علف‌های هرز صورت گرفت. بلافاصله پس از برداشت، نمونه‌ها داخل فلاسک ازت مایع قرار گرفتند و تا انجام آزمایش‌های تعیین مکانیزم مقاومت در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از برگ گیاه با استفاده از روش تغییر یافته دلاپورتا انجام شد (Dellaporta et al., 1983) بدین‌منظور، ابتدا حدود ۰/۲ گرم از نمونه برگی در هاون چینی ریخته و با استفاده از نیتروژن مایع به پودر یکنواخت تبدیل و به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج SDS (۱۰ میلی‌لیتر از محلول Tris-HCL یک مولار با pH=۸، ۱۸ میلی‌لیتر محلول NaCl پنج مولار، چهار میلی‌لیتر محلول EDTA ۰/۵ مولار و دو گرم پودر SDS باهم مخلوط و با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) که از قبل با قرار گرفتن در بن‌ماری کاملاً شفاف شده بود، همراه با

نگهداری شدند (De'lye et al., 2015; Dellaporta et al., 1983). در مرحله بعدی ارزیابی کمیت DNAهای استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ انجام شد. بدین صورت که میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و از نسبت طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تعیین خلوص DNAهای استخراج‌شده استفاده شد. بعد از این مرحله DNAها به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، رقیق شده و برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جهت انجام آزمایش واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز یا PCR پس از سنتز آغازگرهای (پرایمرهای) اختصاصی (جدول ۱) برای علف هرز چچم، در آزمایشگاه با انجام آزمایش‌های مولکولی (PCR)، بروز مقاومت مبتنی بر محل هدف از نظر وقوع جهش‌های نقطه‌ای در هشت موقعیت از اسید آمینه-های Als شامل آلانین (Ala-122)، پرولین (Pro-197)، آلانین (Ala-205)، آسپارتیک (Asp-376)، آرژنین (Arg-377)، تریپتوفان (Trp-574)، سرین (Ser-653) و گلايسين (Gly-654) در آنزیم ALS چچم ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در نمونه‌های ۲۰ میکرولیتری حاوی یک میکرولیتر DNA الگو (تقریباً ۲۰ نانوگرم)، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، هفت میکرولیتر آب مقطر استریل و یک میکرولیتر از هر آغازگر رو به جلو و معکوس انجام شد.

۲۰ میکرولیتر DTT یک مولار و ۲۰ میکرولیتر پروتئین‌کیناز (Pka) به میکروتیوب‌ها اضافه شد. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و هر پنج دقیقه به آرامی سروته شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم پنج مولار سرد به نمونه‌ها اضافه شد. پس از قرار گرفتن به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه روی یخ، ۶۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به تیوب‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شدند. تیوب‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و فاز مایع بالایی به تیوب‌های جدید منتقل شد. سپس با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد، تیوب‌ها به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا DNA به خوبی ته‌نشین شود. نمونه‌ها پس از این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز فوقانی با احتیاط بیرون ریخته شد.

در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰-۷۵ درصد به تیوب‌ها اضافه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس داخل تیوب‌ها با الکل شستشو شد و تیوب‌ها به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه به صورت سروته روی کاغذ صافی قرار گرفتند. به DNAهای خشک‌شده در فضای اتاق ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد

جدول ۱- آغازگرهای (پرایمرهای) مورد استفاده برای تهیه و تعیین توالی ژن ALS در چچم.

Table 1. The primers used to prepare and determine the sequence of the ALS gene in ryegrass.

No.	Oligo Name	Seq. (5-3)	MW	OD (1000(μl))	nmol	Water/tube (μl)	TM	GC%	Mer
1	PHALS4-F	ATCACCAACCACTCTTCCG	5941.9	2.7	15.00	149.95	59.35	55	20
2	AVALS1-R	GCACCACCACTAGGGATCAT	6071	3.3	17.94	179.38	59.35	55	20

پرایمرها برگرفته از تان و همکاران (Tan et al., 2007).

شد. طول قطعه جداشده ۱۵۵۲bp و پرایمر کل طول قطعه جداشده را پوشش داد

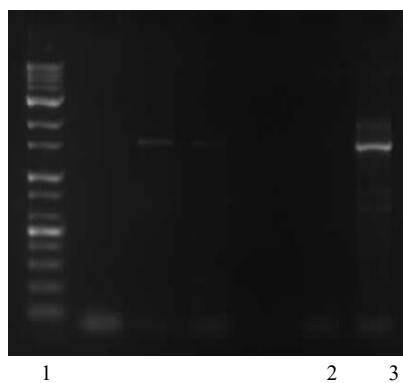
توالی‌یابی

نتایج توالی‌های حاصل شده با رفرنس‌های الگو آرآیدوپسیس (GenBank: AY124092.1) برای ALS در بانک ژن با نرم‌افزارهای BLASTn و Vector NTI (Invitrogen) مقایسه و تفسیر شد. بدین ترتیب احتمال وقوع جهش‌های مختلف در بروز مقاومت مبتنی بر محل هدف به علف‌کش بازدارنده ALS (آتلانتیس)، در علف هرز باریک برگ چچم بررسی شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش غربالگری در گلخانه برای بررسی وضعیت مقاومت در توده چچم L183 جمع‌آوری شده از استان گلستان به صورت گیاهچه در گلدان با غلظت توصیه‌شده (۱/۵ لیتر در هکتار) علف‌کش مزوسولفورون+یدوسولفورون (آتلانتیس، OD 1.2%) با استفاده از روش‌های ارزیابی مقاومت به شرح زیر (جدول ۲) به دست آمد. بر اساس نتایج توده چچم L183 مطابق با روش‌های ارزیابی مقاومت ماس و همکاران (Moss et al., 2007) و ادکینز و همکاران (Adkins et al., 1997) در گروه مقاوم (RRR) قرار گرفت. در نتیجه پس از تأیید قطعی مقاومت توده مورد بررسی، تجزیه مولکولی جهت بررسی سازوکار بروز مقاومت انجام شد.

آزمایش‌های PCR با چرخه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر مدل T100 (Bio-Rad) انجام شد. بدین صورت که ابتدا مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه انجام شد، سپس ۴۴ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲:۳۰ دقیقه، با مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه تکثیر شدند. پس از تکثیر قطعه مورد هدف به منظور شناسایی احتمال وقوع جهش‌های ذکرشده در بالا، استخراج و خالص‌سازی قطعه مورد نظر توسط دستگاه الکتروفورز و با عبور از میان ژل آگارز انجام شد. برای تهیه ژل یک درصد، آگارز در بافر TAE حل و سپس گرم شد. در این مرحله به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول اتیديوم بروماید به آن اضافه شد و سپس داخل قالب با شانه مناسب، جهت تشکیل چاهک‌های مخصوص قرارگیری نمونه، ریخته شد. هنگامی که ژل به خوبی آماده شد، شانه را با دقت بیرون آورده و ژل در محفظه تانک الکتروفورز قرار گرفت. سپس در چاهک اول لدر و در چاهک بعدی قطعه تکثیرشده را بارگذاری کرده و با اعمال ولتاژ ۹۰ آمپر، کار جداسازی DNA انجام شد. پوشش باند حاصل از روی ژل آگارز (شکل ۱) برش و پس از خالص‌سازی برای توالی‌یابی ارسال



شکل ۱- ژل آگارز ۱٪ مربوط به PCR حاصل از چچم DNA L183 با طول قطعه ۱۵۵۲bp. چاهک ۱. نشانگر اندازه وزن مولکولی DNA (1Kb plus Cat.Na. SM354-500). چاهک ۲. محصول PCR بدون استفاده از الگو Nontemplate (ntc). چاهک ۳. محصول PCR حاصل از تکثیر ALS با پرایمرهای اختصاصی چچم.

Figure 1. 1% agarose gel related to PCR obtained from L183 ryegrass DNA with 1552 bp fragment length. Well 1. DNA molecular weight size indicator (1Kb plus Cat.Na. SM354-500), Well 2. PCR product without using Nontemplate (ntc), Well 3. PCR product obtained from ALS amplification with rye specific primers.

جدول ۲- درصد زنده‌مانی، وزن خشک و کاهش وزن تر توده‌های چچم در مقایسه با شاهد بر اساس روش‌های ارزیابی مقاومت (ادکینز و همکاران (Adkins *et al.*, 1997) و ماس و همکاران (Moss *et al.*, 2007)).

Table 2. Survival, dry weight, and reduction of fresh weight in ryegrass accessions compared to the untreated control, according to resistance evaluation systems (Moss *et al.*, 2007 and Adkins *et al.*, 1997).

Sample ID	% of Control			Rating System	
	Survival	Dry weight	Fresh weight reduction	Moss*	Adkins**
L183	89/29	86/22	9/28	RRR	Resistant

* براساس روش ماس و همکاران (۲۰۰۷) توده‌هایی که درصد کاهش وزن تر آن‌ها نسبت به شاهد بین صفر تا ۳۶، بین ۳۶ تا ۷۲، بین ۷۲ تا ۸۱ و بین ۸۱ تا ۱۰۰ باشد به ترتیب به عنوان توده‌های مقاوم (RRR)، مقاوم (RR)، مشکوک به مقاومت (R?) و حساس (S) به علفکش طبقه‌بندی می‌شوند. ** در روش ادکینز و همکاران (۱۹۹۷) توده‌هایی که درصد وزن خشک و زنده‌مانی آن‌ها به ترتیب بیش از ۸۰ و ۵۰ درصد به عنوان توده "مقاوم"، کمتر از ۸۰ و بیشتر از ۵۰ درصد باشد، به عنوان توده "احتمالاً مقاوم" و در صورتی که کمتر از ۵۰ درصد باشند، به عنوان توده "حساس" در نظر گرفته می‌شوند.

*According to the Moss *et al.* (2007) method, accessions with fresh weight reduction between 0 and 36, between 36 and 72, between 72 and 81, and between 81 and 100, respectively are classified as resistant (RRR), resistant (RR), suspected resistance (R?), and sensitive (S) to the herbicide. **In the Adkins *et al.* (1997) method, accessions with dry weight and survival of more than 80% and 50%, respectively, are classified as "resistant" accessions; those with dry weight less than 80% and survival more than 50% as "probably resistant"; and if both are less than 50%, they are considered "sensitive" accessions.

اسیدآمین ترئونین (شکل ۲) و هم‌زمان جایگزینی نوکلئوتید G (گوانین) اسیدآمین تریتوفان با نوکلئوتید T (تیمین) از طریق تغییر اسیدآمین و ایجاد اسیدآمین لوسین (شکل ۳) منجر به بروز دو جهش به‌طور هم‌زمان در توده چچم L183 شده است.

نتایج آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی مولکولی توده چچم با طول قطعه جدا شده ۱۵۵۲bp در برازش با ژن ALS آراییدوپسیس نشان داد که جایگزینی نوکلئوتید C (سیتوزین) اسیدآمین پرولین با نوکلئوتید A (آدنین) از طریق تغییر اسیدآمین به

L183 استان گلستان در پیک‌ها قابل مشاهده بود که این آل می‌تواند مقاومت به علف‌کش را در پی داشته باشد. بدین منظور ژن ALS گونه چچم مورد بررسی (L183)، با وجود پیک‌های روی هم، برای احتمال پیدا کردن آل مقاوم جستجو شد.

بنابراین احتمال وجود جهش متناظر در جایگزینی اسید آمینه پرولین (pro) در کدون 197 به اسید آمینه ترئونین (Thr) (شکل ۴) و اسید آمینه تریپتوفان (Trp) در کدون 574 به اسید آمینه لوسین (Leu) (شکل ۵) در خوانش دو جهت ژن ALS توده چچم

(493) 493 500 510 520 530 540 550 560
ALS lolium L-183 contig (157) ACGGGGCAGGTCCCGCGCGCATGATCGGCACGGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTACCCGCTCCA'
ALS Lolium rigidum (493) ACGGGGCAGGTCCCGCGCGCATGATCGGCACGGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTACCCGCTCCA'
Consensus (493) ACGGGGCAGGTCCCGCGCGCATGATCGGCACGGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATCGTCGAGGTACCCGCTCCA'

شکل ۲- جایگزینی نوکلئوتید C در کدون (CCG) اسید آمینه پرولین با نوکلئوتید A و ایجاد کدون (ACG) اسید آمینه ترئونین.

Figure 2. Replacing nucleotide C in the codon (CCG) of the amino acid proline with nucleotide A and creating the codon (ACG) of the amino acid threonine.

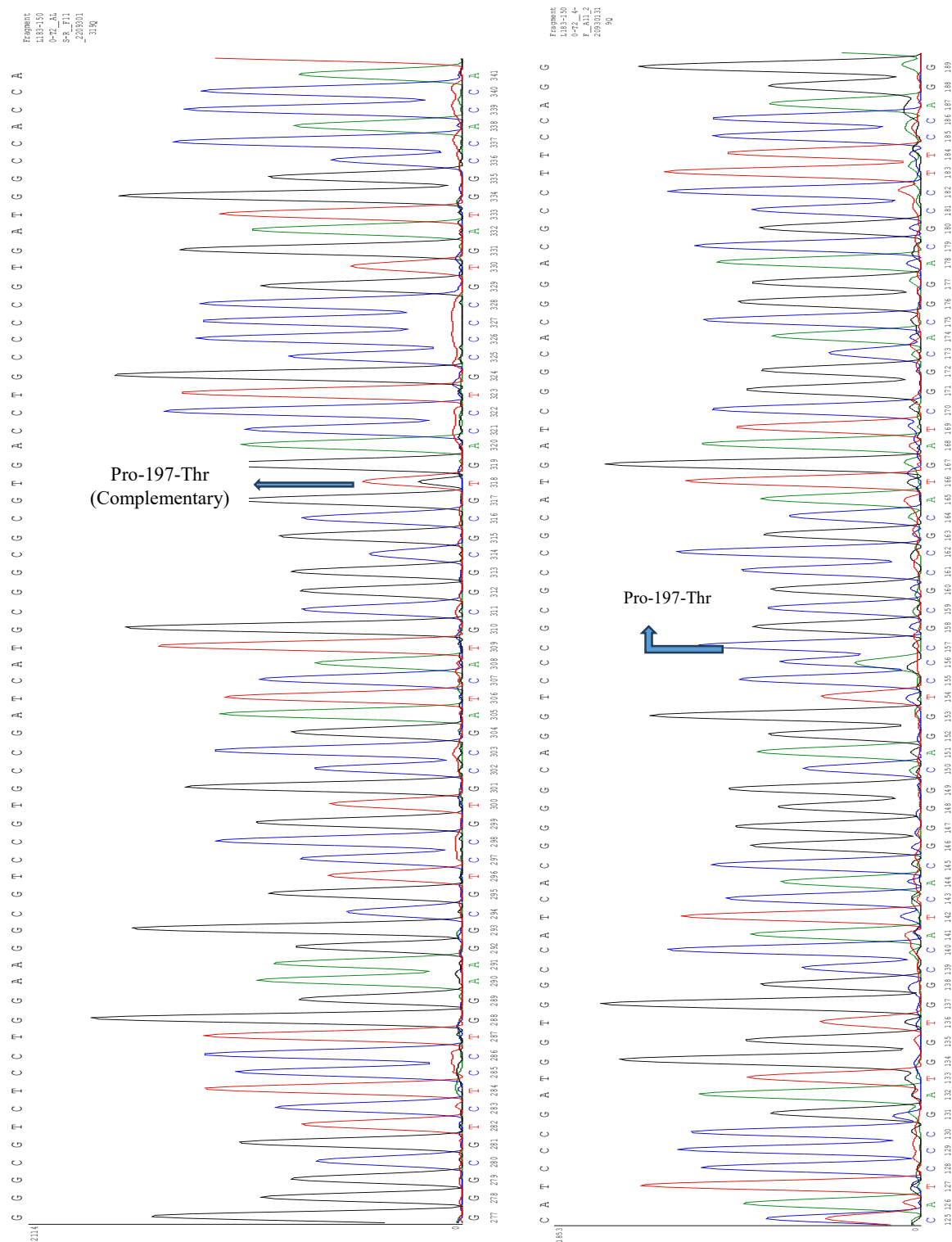
(1674) 1674 1680 1690 1700 1710 1720
ALS lolium L-183 contig(1338) ATACCTTGGGAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC'
ALS Lolium rigidum(1674) ATACCTTGGGAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC'
Consensus(1674) ATACCTTGGGAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGAC'

شکل ۳- جایگزینی نوکلئوتید G در کدون (TGG) اسید آمینه تریپتوفان با نوکلئوتید T و ایجاد کدون (TTG) اسید آمینه لوسین.

Figure 3. Substitution of nucleotide G in codon (TGG) amino acid tryptophan with nucleotide T and creating codon (TTG) amino acid leucine

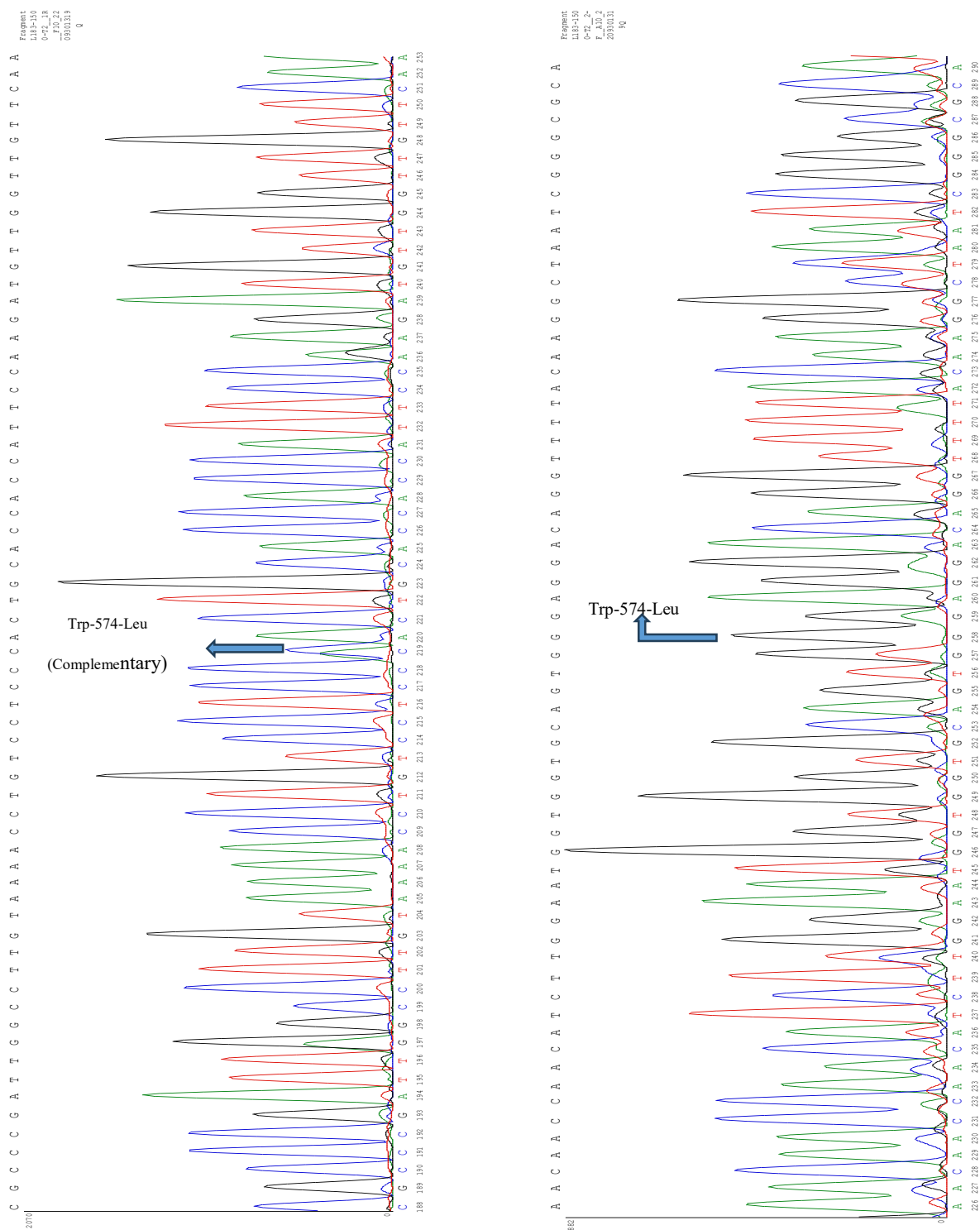
DNA از طریق ایجاد تغییر در آمینواسیدهای پروتئین محل هدف، موجب عدم تأثیر علف‌کش آتلانتیس شده است. به‌طور کلی، از هشت مورد جهش-گزارش شده ژن ALS توسط محققان، (Powles & Yu, 2014; Tranel *et al.*, 2016) دو جهش به‌طور هم‌زمان شامل جایگزینی اسید آمینه پرولین در کدون ۱۹۷ و اسید آمینه تریپتوفان در کدون ۵۷۴ در توده چچم مورد بررسی، شناسایی شد.

همانطور که در نتایج توالی‌یابی قابل مشاهده است، پیک دارای جهش، معمولاً کوتاه‌تر از پیک بدون جهش خود را نشان داده است و این باعث می‌شود که نتایج توالی‌یابی که بر اساس توالی توافقی^۱ ارائه می‌شود قادر به تشخیص آن نباشد و تنها آل اصلی را به دلیل وجود تعداد نسخه بیشتر شناسایی کند. با توجه به نتایج توالی‌یابی، احتمالاً توده چچم L183 جهش یافته، با بروز جهش‌های نقطه‌ای و سپس تغییر یک نوکلئوتید در ژن رشته



شکل ۴- احتمال وجود جهش متناظر آراییدوپسیس پرولین ۱۹۷ ترئونین (Pro-197-Thr) در خوانش دو جهته ژن ALS نمونه چچم L183. این آلل می‌تواند مقاومت به علف‌کش را در پی داشته باشد.

Figure 4. Probability of the corresponding *Arabidopsis* proline-197-threonine mutation in the bidirectional reading of the ALS gene of ryegrass L183. This allele can lead to herbicide resistance.



شکل ۵- احتمال وجود جهش متناظر آرابیدوپسیس تریتوفان به لوسین (Trp-574-Leu) در خوانش دو جهته ژن ALS نمونه چچم L183. این آلل می‌تواند مقاومت به علف‌کش را در پی داشته باشد.

Figure 5. Probability of the corresponding *Arabidopsis* mutation from tryptophan to leucine (Trp-574-Leu) in the bidirectional reading of the ALS gene of the ryegrass L183 sample. This allele can lead to herbicide resistance.

طبق گزارش غنی‌زاده و همکاران (Ghanizadeh *et al.*, 2022) نیز جایگزینی پرولین به لوسین در کدون ۱۹۷ ژن ALS چچم شناسایی شد که نشان‌دهنده ارتباط مکانیسم مبتنی بر محل هدف با مقاومت به علف‌کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل است. مطابق با گزارش ایشان، در پژوهش حاضر نیز جایگزینی پرولین به ترئونین در همان کدون ۱۹۷ ژن ALS چچم، احتمالاً سبب بروز مکانیسم مبتنی بر محل هدف به علف‌کش یدوسولفورون-متیل-سدیم+مزوسولفورون-متیل شده است.

بنا به گزارش بکی و همکاران (Beckie *et al.*, 2012) موقعیت‌های اسیدآمینه با توالی اسیدآمینه ژن ALS در شاهی‌گوش‌موشی (آراییدوپسیس) مطابقت داشتند. همچنین طی گزارشی مشخص شد که ژن ALS نسبت به پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) آسیب‌پذیر است، بنابراین یک تغییر نوکلئوتیدی در آن که منجر به تغییر غیر مترادف شود، می‌تواند باعث جایگزینی اسیدآمینه، تغییر ساختار آنزیم و جلوگیری از اتصال علف‌کش شود (Ntoanidou *et al.*, 2016). بنا به گزارش بکی و همکاران (Beckie *et al.*, 2012) تعداد موقعیت‌های نوکلئوتید طبق هم‌ترازی انجام‌شده ۱۶۷۱ bp (۵۵۷ اسیدآمینه) است که به‌عنوان موقعیت بروز مقاومت در ژن ALS می‌توان به آن‌ها مراجعه کرد. بنا به گزارش آن‌ها در آزمایش ایشان، در مجموع ۲۱ چندشکلی و پلی‌مورفیسم باعث بروز مقاومت می‌شوند که چهار عدد از این چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی غیر مشابه بوده و

باعث تفاوت‌هایی در توالی اسیدآمینه می‌شوند، اما سبب بروز مقاومت به ALS نمی‌شوند چون در جمعیت حساس نیز وجود داشتند. از طرفی، در گزارشی (Beckie *et al.*, 2012) دو تا از چهار جمعیت یولاف مقاوم به بازدارندگان ALS در این مطالعه جهش محل هدف در سرین در کدون ۶۵۳ توالی ژن ALS و یک جهش در سرین در کدون ۶۵۳ به ترئونین (Ser653Thr) در جمعیت‌های قدیمی و یک جهش در اسیدآمینه سرین به آسپارژین (Ser653Asn) در جمعیت لورن بو که اولین گزارش از جهش‌های محل هدف ژن ALS گونه‌های یولاف است. در جمعیت‌های حساس موریس و کرنان این جهش‌ها رخ داده بود، ولی دارای اسیدآمینه سرین (AGT) در موقعیت 653 بودند.

هیچ جهش ALS شناخته‌شده دیگری در دو جمعیت مقاوم یولاف به بازدارندگان ALS مشاهده نشد، لذا به گزارش آن‌ها احتمالاً متابولیسم علف‌کش، دلیل مقاومت در این جمعیت‌ها بوده است. همانطور که اشاره شد علاوه بر جهش‌های نقطه‌ای در محل هدف که می‌تواند منجر به مقاومت عرضی شود، مقاومت غیر هدف (NTSR) نیز به همراه متابولیسم تسریع‌شده می‌تواند مکانیسم مهمی در ارتباط با مقاومت به علف‌کش‌ها نیز باشد (Riar *et al.*, 2012; Iwakami *et al.*, 2013; Busi *et al.*, 2017). از طرفی، بنا به گزارش ایواکمی و همکاران (Iwakami *et al.*, 2013) پروتئین‌های مونواکسیژناز سیتوکروم (P450) نیز می‌توانند علف‌کش‌های بازدارنده ALS را متابولیزه کرده و در نتیجه میزان علف‌کشی را که به محل اثر

می‌رسند را کاهش دهند. بنا به گزارش غنی‌زاده و همکاران (Ghanizadeh *et al.*, 2022) پیش‌تیمار با مهارکننده سیتوکروم P450 سطح مقاومت علف-کش یدوسولفورون متیل‌سدیم + مزوسولفورون-متیل از بازدارنده‌های ALS، را تا ۴۶ برابر در جمعیت‌های چچم مقاوم به این علف‌کش کاهش داد، لذا افزایش متابولیسم علف‌کش باعث ایجاد مکانیزم مقاومت محل غیر هدف به این علف‌کش می‌شود. مقاومت مبتنی بر متابولیسم بازدارنده‌های ALS به وسیله کاهش متابولیسم ایمازامتابنز-متیل به فرم فعال بیولوژیکی اسیدایمازامتابنز در جمعیت یولاف وحشی شمال داکوتا نیز گزارش شده است (Nandula & Messersmith, 2000).

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این تحقیق نشان داد جهش‌های نقطه‌ای در توده چچم استان گلستان، موجب بروز جهش محل هدف در دو نقطه از ژن ALS چچم و به دنبال آن موجب بروز مقاومت به علف‌کش شده است. بنا به گزارش آل ابراهیم و همکاران (Alebrahim *et al.*, 2017) بررسی سازوکار

مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز می‌تواند روش‌های مفیدی برای کنترل و مدیریت علف‌های هرز توسط متخصصین را فراهم کند. لذا جهت حذف گیاهان مقاوم و ممانعت از توسعه این گیاهان به سایر مناطق، شناسایی مزارع با توده‌های مشکوک به مقاومت و جمع‌آوری این توده‌ها، جهت بررسی مکانیزم ایجاد مقاومت، در جهت مدیریت مقاومت ایجادشده، ضروری است. همچنین بنا به گزارش ثابت‌زنگنه و همکاران (Sabet Zangeneh *et al.*, 2016) تفاوت‌های بین بیوتیپ‌های علف‌های هرز مقاوم و حساس نیز، سبب دستیابی به یک استراتژی مدیریتی برای کنترل علف‌های هرز، بدون استفاده از علف‌کش و مشخص‌شدن پراکنش جمعیت‌های مقاوم به علف‌کش می‌شود. لذا شناسایی توده‌های حساس و مشکوک به مقاومت و به دنبال آن شناسایی مکانیزم مقاومت در توده‌های مقاوم، کمک شایان توجهی به اتخاذ و اجرای برنامه‌های کنترل علف هرز چچم و جلوگیری از گسترش مقاومت در مزارع خواهد کرد.

منابع

- Adkins, S. Wills, D. Boersma, M. Walker, S. Robinson, G. Mcleod, R. and Einam, J. 1997. Weeds resistant to chlorsulfuron and atrazine from the north east grain region of Australia. *Weed Res.* 37(5): 343-349.
- Alebrahim, M.T. Majd, R. Abdollahi, F. Zangouejinejad, R. Dayan, F.E. Mathiassen, S.K. and Kudsk, P. 2021. Absorption and metabolism of foliar-applied rimsulfuron in potato (*Solanum tuberosum* L.), common lambsquarters (*Chenopodium album* L.) and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.). *Potato Res.* 64(4): 635-648.
- Alebrahim, M.T. Zangouejinejad, R. and Tseng, T.M. 2017. Biochemical and molecular knowledge about developing herbicide-resistant weeds. *Herbicide resistance in weeds and crops.* 101-132.

- Beckie, H.J. Heap, I.M. Smeda, R.J. and Hall, L.M. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technol.* 41: 523-534.
- Beckie, H.J. Lozinski, C. and Shirriff, S. 2009. Alberta weed survey of herbicide-resistant weeds in 2007. Saskatoon, SK: Agriculture and Agri Food Canada Weed Survey Series Pubi. 09-1. 36p
- Beckie, H.J. Suzanne, I. Warwick, and Sauder, C.A. 2012. Basis for herbicide resistance in Canadian populations of wild oat (*Avena fatua*). *Weed Sci.* 60: 10-18.
- Busi, R. Gaines, T.A. and Powles, S. 2017. Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Pest Manag. Sci.* 73(2): 410-417.
- De'lye, C. and Boucansaud, K. 2008. A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Res.* 48: 97-101.
- De'lye, C. Duhoux, A. Fanny, P. Chance, W. Riggins, and Tranel, P.J. 2015. Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Sci. Special Issue*: 91-115.
- De'lye, C. Pernin, F. and Michel, S. 2011. 'Universal' PCR assays detecting mutations in acetyl-coenzyme A carboxylase or acetolactate-synthase that endow herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* 51: 353-362.
- Dehghan Banadaki, M. 2018. Management of weeds in wheat fields. Higher Scientific-Applied Education Institute of the Ministry of Agricultural Jihad. 69 pp.
- Dellaporta, S.L. Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Duggleby, R.G. McCourt, J.A. and Guddat, L.W. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.* 46(3): 309-324.
- Gaines, T.A. Duke, S.O. Morran, S. Rigon, C.A.G. Tranel, P.J. Küpper, A. and Dayan, F.E. 2020. Mechanisms of evolved herbicide resistance. *J. Biol. Chem.* 295(30): 10307-10330.
- Ghanizadeh, H. Buddenhagen, C.E. Griffiths, A.G. Harrington, K.C. and Ngow, Z. 2022. Target-site and non-target site resistance mechanisms are associated with iodosulfuron resistance in *Lolium perenne* (L.). *New Zealand J. of Agri. Res.* 67(1): 40-53.
- Heap, I.M. 2006. International survey of herbicide resistant weeds. Annual report internet. <http://www.weed science.org>. Accessed on 12/6/2011.
- Heap, I.M. 2016. Herbicide resistant weeds. *Integ. Pest Manag.* 3: 281-301.
- Heap, I. and Knight, R. 1982. A population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 48: 156-157.
- Heap, I.M. 2024. International herbicide-resistant weed database. <http://www.weedscience.org>.
- Hidayat, I. and Preston, C. 2001. Cross-resistance to imazethapyr in a fluazifop- p-butyl-resistant population of *Digitaria sanguinalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 190-195.
- Iwakami, S. Uchino, A. Kataoka, Y. Shibaike, H. Watanabe, H. and Inamura, T. 2013. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Manag. Sci.* 70(4): 549-58.
- Joudi, M. and Ebadi, A. 2014. Evaluation of agronomic traits of Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their associations under terminal heat stress. *Res. in Agric. Plants*, 3(1): 42-54.
- 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.
- Mallory-Smith, C.A. and Namuth, D. 2006. Herbicide resistance: Mechanisms, inheritance, and molecular genetics. Webpage: <http://www.plantadsoil.unl.edu>, visited: 2007/04/13.
- Mallory-Smith, C.A. Thill, D.C. and Dial, M.J. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol.* 4: 163-168.

- Mamnoie, A. Mojab, M. Ghezeli, F. Abasi, J. Shasti, M. Ariaifar, M.A. Esmaili, A. and Shahrivar, M. 2023. Management guidelines for rye weed (*Lolium rigidum* Gaudin) in wheat fields. Fars Province Agricultural Jihad Organization, Agric Edu Publication. 19 pp.
- Minbashi, M. Esfandiyari, H. Pourazar, R. Baghestani, M.A. Zand, A. Veysi, M. Sabeti, P. Jamali, M.R. Hatami, S. Haghighi, A. Maknali, A. Mousavi, Nazer Kakhaki, H. Narimani, V. Nouralizade, M. Valiolahpour, R. and Nourozzade, R. 2015. Evaluation of weed management in wheat fields of different area of Iran. Iran. J. of Weed Sci. 11(1), 13-26.
- Moss, S.R. 1995. Techniques for determining herbicide resistance. Brighton Crop Prot. Conf. Weeds, 547-556.
- Moss, S.R. Perryman, S.A. and Tatnell, L.V. 2007. Managing herbicide-resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): Theory and practice. Weed Technol. 21(2): 300-309.
- Nandula, V.K. and Messersmith, C.G. 2000. Mechanism of wildoat (*Avena fatua* L.) resistance to imazamethabenz-methyl. Pestic. Biochem. Physiol. 68: 148-155.
- Ntoanidou. S. Kaloumenos, N. Diamantidis, G. Madesis, P. and Eleftherohorinos, I. 2016. Molecular basis of *Cyperus difformis* cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. Pestic. Biochem. Phys. 127: 38-45.
- Patzoldt, W.L. Tranel, P.J. and Hager, A.G. 2002. Variable herbicide responses among illinois waterhemp (*Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus*) populations. Crop Protec. 21: 707-712.
- Powles, S.B. and Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. Annu. Rev. Plant Biol. 61: 317-47.
- Riar, D.S. Norsworthy, J.K. Bond, J.A. Bararpour, M.T. Wilson, M.J. and Scott, R.C. 2012. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Int. J. Agron. 1-8.
- Sabet Zangeneh, H. and Zangeneh, M. 2021. Evaluation of resistance of ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) to herbicides wheat in field conditions. 9th Iranian Weed Science Congress 16&17 Nov. 2021-Tehran.
- Sabet-Zangheneh, H. Mohammaddoust Chamanabad, H. Zand, E. Asghari, A. Alami-Saeid, K. and Alebrahim, M. 2016. Study of fitness cost in three rigid ryegrass populations susceptible and resistant to acetyl-coA carboxylase inhibiting herbicides. Frontiers in Ecol. and Evol. 4: 142.
- Sasanfar, H.R. Khalil Tahmasebi, B. Zand, E. Zamani, M.H. and Keshtkar, E. 2024. Cross- and multiple-resistance of the problematic grass weeds to the commonly used herbicides of wheat and canola. Iranian J. of Fie. Cro. Sci. 55(1), 89-104.
- Singh, S. Kirkwood, R.C. and Marshall, G. 1999. Biology and control of *Phalaris minor* Retz. (*Littleseed canarygrass*) in wheat (Review article). Crop Protec. 18: 1-16.
- Tan, M.K. Preston, C. and Wang, G.X. 2007. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. Weed Res. 47: 534-541.
- Tavasoli, A. Gherekhloo, J. Ghaderi Far, F. Zand, E. and Osuna, M. 2021. Rapid test for detecting clodinafop propargyl resistance in ryegrass. 9th Iranian Weed Science Congress 16&17 Nov. 2021-Tehran.
- Thill, D. and Lemerle, D. 2001. World wheat and herbicide resistance. 10.1201/9781420039085-5.
- Tranel, P.J. Chenxi, W. and Ahmed, S. 2016. Target-site resistances to ALS and PPO inhibitors are linked in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). Weed Sci. 65(1): 4-8.
- Tranel, P.J. and Wright, T.R. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? Weed Sci. 50: 700-712.
- Yuan, J.S. Tranel, P.J. and Stewart, C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: A family business. Trends in Plant Sci. 12: 6-13.

- Zamani, M.H. Keshtkar, E. Zand, E. and Sasanfar, H.R. 2019. Cross and multiple resistance of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) to some common ACCase and ALS inhibitor herbicides in wheat fields of Fars province. Iran. Weed Sci. Cong. 27-29 Aug. 2019.
- Zand, E. Atri, A. Baghestani, M.A. Dastaran, F. and Pourbaig, M. 2010. Resistance of ryegrass (*Lolium rigidum* L.) biotypes to clodinafop propargil herbicide in Fars province. Agric. (Research and Construction). 23(4): 70-78.
- Zand, E. Baghestani, M.A. Soufizadeh, S. Eskandari, E. PourAzar, R. Veysi, M. Mousavi, K. and Barjasteh, A. 2007. Evaluation of some newly registered herbicide for weed control in wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. Crop Protec. 26: 1349-1358.