

بررسی مقاومت علف‌های هرز باریک برگ به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل با استفاده از

روش‌های گلخانه‌ای و مولکولی

اسکندر زند*^۱، آرش رزمی^۲، فاطمه بناء کاشانی^۲، فهیمه نظری^۲، مهدی راستگو^۳

۱- عضو هیات علمی بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه گیاه‌پزشکی ۲- محقق بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه گیاه‌پزشکی ۳- دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱

چکیده

به منظور ارزیابی کارایی روش‌های مولکولی برای تشخیص علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش، ۶۹ بیوتیپ از علف‌های هرز یولاف وحشی، خونی واش و چچم (*Lolium spp.*) مقاوم و حساس به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل مورد آزمایش قرار گرفت. در این آزمایش از روش dCAPS که روشی ساده برای تشخیص وضعیت I-1781-L در آنزیم استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز علف‌های هرز باریک برگ است، استفاده شد. در این روش توده‌های مقاوم هتروزیگوت (Ile/Leu1781) تشخیص داده شد و نتایج آزمایش‌های مولکولی برای علف‌های هرز یولاف وحشی، خونی واش و چچم به ترتیب ۹۰٪، ۷۹٪ و ۱۰۰٪ مشابه نتایج آزمایش گلخانه‌ای بود. در مجموع شباهت آزمایش‌های مولکولی و گلخانه‌ای حدود ۸۵ درصد تشخیص داده شد و جانشینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile/Leu 1781) به عنوان مهم‌ترین مکانیزم مقاومت در بیوتیپ‌های مورد مطالعه شناخته شد. ناهمخوانی جزئی (حدود ۱۵ درصد) بین نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و مولکولی نیز احتمالاً به مکانیزم مقاومت مبتنی بر غیر محل هدف (افزایش متابولیسم) و یا جهش‌های ایجاد شده در سایر نقاط (به جز Ile/Leu 1781) مربوط می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز و روش dCAPS

* Correspondence to: eszand@yahoo.com

مقدمه

(Boutsalis, 2001)، ارزیابی قطعات برگ (Patzoldt & Tranel, 2002) و ارزیابی آنزیمی (Corbett & Tardif, 2006). روش‌های فوق‌علی‌رغم برخورداری از دقت بالا، مستلزم وجود فضای وسیع برای انجام آزمایش و صرف وقت زیاد بوده و در ضمن قادر به تشخیص مقاومت عرضی و مکانیزم مقاومت نیستند (Corbett & Tardif, 2006; Kaundun & Windass, 2006; Delye *et al.*, 2002). تحقیقات زیادی وجود دارد که در آنها از روش‌های مبتنی بر DNA به عنوان یک روش ساده در مطالعات مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها استفاده شده است. (Kaundun & Windass, 2006) از روش^۱ dCAPS برای تشخیص محل اصلی موتاسیون بوجود آمده در علف‌های هرز باریک برگ نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase استفاده نمودند. آنها معتقدند که روش dCAPS یک روش ساده، اقتصادی و قابل استفاده برای گونه‌های مختلف است که به راحتی قادر است توده‌های مقاوم هموزیگوت (Leu/Leu 1781) و هتروزیگوت (Ile/Leu1781) را تشخیص داده و مبنایی را برای اندازه‌گیری دقیق فراوانی آلل غالب Leu در جمعیت‌های خاص بدست دهد.

در این مقاله نیز از روش مبتنی بر PCR (روش dCAPS) برای تشخیص مقاومت علف‌های هرز باریک برگ یولاف وحشی، خونی واش و چچم نسبت علف‌کش‌های بازدارنده ACCase استفاده شده تا کارایی این روش نسبت به روش استفاده از گیاه کامل در گلخانه مورد مقایسه قرار گیرد.

مواد و روش

مواد گیاهی

در این آزمایش ۶۹ توده از علف‌های هرز باریک برگ یولاف وحشی، خونی واش و چچم که طی سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از استان‌های فارس، خوزستان، گلستان و ایلام جمع‌آوری شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). در آزمایش‌های قبلی مقاومت این توده‌ها نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase، از طریق روش کشت گیاه کامل در گلدان،

مقاومت به علف‌کش یک پدیده جهانی است و تا اواسط سال ۲۰۱۱ حدود ۳۵۸ بیوتیپ از ۱۹۷ خانواده نسبت به ۱۹ گروه از علف‌کش‌ها مقاوم شده‌اند (Heap, 2011). در برخی از مناطق دنیا مقاومت برخی از علف‌های هرز باریک برگ نسبت به علف‌کش‌ها، به حدی مشکل‌ساز شده است، که به یک تهدید جدی برای پایداری تولید تبدیل شده است. علی‌رغم آنکه علف‌های هرز باریک برگ حدود ۲۵ درصد از گونه‌های هرز را به خود اختصاص می‌دهند، ولی ۴۰ درصد از بیوتیپ‌های مقاوم مربوط به علف‌های هرز باریک برگ هستند (Beckie, 2007). بازدارنده‌های ACCase گروهی از علف‌کش‌های پس‌رویشی، بسیار کارآمد و با اهمیت از نظر اقتصادی هستند که به عنوان باریک برگ کش انتخابی در گیاهان زراعی پهن برگ و بعضی از غلات مورد استفاده قرار می‌گیرند.

براساس آخرین اطلاعات ارائه شده در پایگاه کمیته کاری مقاومت به علف‌کش‌ها تا اواسط سال ۲۰۱۱ حدود ۳۷ گونه از علف‌های هرز باریک برگ نسبت علف‌کش‌های بازدارنده ACCase مقاوم شده‌اند (Heap, 2011). در ایران مقاومت علف‌های هرز باریک برگ به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ گزارش شد (Zand *et al.*, 2006) و تاکنون مقاومت علف‌های هرز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Dur.)، خونی واش (*Phalaris minor* Retz., *P. brachystachys* Link., *P. paradoxa* L.) چچم (*Lolium rigidum* Gaud.) در سطح وسیعی از مزارع گندم کشور گزارش شده است (Zand *et al.*, Zand *et al.*, 2006). 2007;

برای تایید مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد که برخی از این روش‌ها عبارتند از: روش زیست‌سنجی بذر و گیاه کامل (Bena Kashani *et al.*, 2007; Corbett & Tardif, 2006) ارزیابی در ظرف پتری (Cirujeda *et al.*, 2001) آزمون گرده، آزمون از طریق تکثیر پنجه‌ها

¹ Drived cleaved amplified polymorphic sequence

۴۰۰ میکرولیتر محلول ۲۴ به ۱ کلروفرم: ایزوآمیل الکل - که حاوی ۵٪ فنل بود- اضافه شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند و سپس فاز شفاف بالایی به یک تیوب جدید انتقال داده شد. به هر کدام از میکروتیوب های جدید معادل دو سوم حجم مایع درون آنها، ایزوپروپانول سرد اضافه به مدت نیم ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. در مرحله بعد میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و فاز بالایی دور ریخته شد و رسوب شفاف داخل آنها با اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شده و سپس در هوای آزاد خشک شدند. در مرحله نهایی نیز به هر کدام از میکروتیوب ها ۵۰ میکرولیتر بافر TE اضافه گردید (Wan Kang et al., 1998).

تعیین کمیت و کیفیت DNA

برای تعیین کمیت DNA از دستگاه بیوفتومتر (ساخت شرکت اپندورف آلمان) استفاده شد و برای تعیین کیفیت DNA و اطمینان از خلوص DNA استخراج شده، کلیه نمونه ها پس از استخراج، توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

واکنش های PCR با کمک ترمال سایکلر Bio Rad در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر کدام از واکنش های ۲۵ میکرولیتری حاوی یک میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) با غلظت ۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر از 10XPCR buffer (بدون Mg Cl₂), یک میکرولیتر از Mg Cl₂ ۵۰ میلی مولار، ۰/۲۵ میکرولیتر از dNTP mix ۲۰ میلی مولار، ۲ میکرولیتر از DNA Taq ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq DNA polymerase ۵ واحد و بقیه تا حجم ۲۵ میکرولیتر نیز آب مقطر دیونیز بود. برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل خود از سه مرحله مجزا

مطالعه شده بود (Zand et al., 2009) و توده های مقاوم بر اساس نظر ادکینز و همکاران (Adkins et al., 1997) تشخیص داده شده بودند. ادکینز و همکاران توده ای را نسبت به یک علف کش مقاوم می دانند که درصد وزن خشک آن نسبت به شاهد حداقل ۸۰٪، درصد گیاه باقی مانده آن نسبت به شاهد علف کش نخورده بیش از ۵۰٪ و میزان کنترل آن بر اساس شاخص EWRC حداکثر ۴۰٪ باشد. ضمناً در صورتی که درصد وزن خشک حداقل ۵۰٪ و درصد گیاه باقی مانده بیش از ۵۰ درصد شاهد بدون علف کش باشد، آن توده را "احتمالاً مقاوم" می دانند.

استخراج DNA

DNA مورد نیاز در این تحقیق پس از تهیه محلول ها و بافرهای لازم از بذر استخراج شد (Wan Kang et al., 1998)

بافر استخراج: این بافر از ترکیب ۲۰ میلی لیتر Tris- Hcl با غلظت یک مولار با pH = ۸، ۴ میلی لیتر NaCl با غلظت ۵ مولار، ۵ میلی لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار و ۰/۵ گرم SDS 5% تهیه گردید.

بافر 2% CTAB: این بافر از ترکیب ۱۰ میلی لیتر Tris- Hcl با غلظت ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۸، ۴ میلی لیتر EDTA با غلظت ۲۰ میلی مولار با pH = ۸، ۲۸ میلی لیتر NaCl با غلظت ۱/۴ مولار و ۱ گرم PVP 1% تهیه گردید.

برای استخراج DNA ابتدا پوشش بذر جدا و بذر به دو قسمت تقسیم شد. بذور نصف شده در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفتند. سپس به هر کدام از میکروتیوب ها، ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی پروتئیناز K (با غلظت ۵۰ میکروگرم)، اضافه شد و میکروتیوب ها به مدت یک ساعت در دستگاه بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد بذور موجود در درون بافر استخراج با استفاده از یک میله ی شیشه ای استریل خرد شدند و به هر کدام از میکروتیوب ها ۴۰۰ میکرولیتر بافر CTAB ۲ درصد افزوده شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس به هر کدام

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.

شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای

جدول ۱- نام و توالی پرایمر

پرایمرها Primer	توالی‌ها Sequence 5'-3'	منبع Reference
NsiI1781f NsiI1781r	CTGTCTGAAGAAGACTATGGCCG AGAAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTCCATGCA	Kaundun and Windass, 2006 -

هموزیگوت آلل گونه وحشی حساس یعنی AA است و گونه‌های مقاومی که هر دو آلل وحشی و جهش یافته را در خود داشتند (که نشان دهنده وجود مقاومت مبتنی بر هدف به صورت هتروزیگوس یعنی AC یا AT می باشد)، در معرض آنزیم برشی، هر دو باند ۱۳۰bp و ۱۶۵bp را ایجاد نمودند (RS) (شکل ۱ ب). شایان ذکر است که گونه‌های جهش یافته مقاوم (RR)، باید تولید باند ۱۶۵ bp کنند که این نیز دلیل بر وجود فرم هموزیگوت آلل گونه جهش یافته (مقاوم) یعنی TT یا CC می باشد. در این آزمایش گونه‌های جهش یافته مقاوم (RR) مشاهده نشد.

در ادامه بر اساس موارد فوق، به تفکیک گونه‌های علف هرز، تعداد بیوتیپ‌های حساس و مقاوم آنها مشخص شد (جدول ۲) که در ادامه مورد بحث قرار خواهد گرفت. از آنجا که تعداد نمونه‌ها زیاد بود، در این گزارش فقط نتایج حاصل از PCR و برش آنزیمی توده‌های یولاف وحشی آورده شده است (شکل ۱).

جدول ۲ نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و مولکولی در گونه‌های *P. paradoxa*, *Phalaris. Minor* و *Lolium multiflorum* و *Avena ludoviciana*, *P. Brachystachys* Lam. را نشان می‌دهد. در این جدول اطلاعات مربوط به ۶۹ توده از علف‌های هرز باریک برگ یولاف وحشی، خونی واش و چچم که طی سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از استانهای فارس، خوزستان، گلستان و ایلام جمع‌آوری و مقاومت و یا حساسیت آنها نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase، از

برش آنزیمی قطعه تکثیر شده

به منظور تشخیص توده‌های مقاوم و حساس، واکنش هضم آنزیمی در حجم نهایی ۳۲ میکرولیتر طبق توصیه شرکت سازنده (فرمتاز) و با مقادیر ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x و ۲ میکرولیتر آنزیم برشی *Mph1103I* (*AvaIII*) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ۶ 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.

نتایج و بحث

جایگزینی نوکلوتید های C و T بجای A در موقعیت ۵۳۴۱ ژن آنزیم استیل کو آنزیم آکریوکسیلاز باعث جایگزینی اسید آمینه لوسین با ایزولوسین (I-1781-L) شده و این جهش باعث مقاومت بالا به برخی علف‌کش‌های بازدارنده ACCase می‌شود (Delye, 2005). جهت تشخیص گیاهان مقاوم واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) بر اساس روش Kaundun & Windass (2006) انجام و باندی در حدود ۱۶۵bp در همه توده‌ها مشاهده گردید (شکل ۱ الف). پس از اطمینان از موفقیت واکنش PCR و تولید باند مورد نظر، در مرحله بعد محصولات PCR با استفاده از آنزیم *Mph1103I* (*AvaIII*) در معرض هضم قرار گرفتند که در اینجا، گونه‌های حساس (SS) تولید باند ۱۳۰bp کردند و این نشان از وجود فرم

کند. شایان ذکر است که ۱۰٪ عدم همخوانی بین نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی را می‌توان هم به مکانیزم مقاومت مبتنی بر غیر محل هدف (افزایش متابولیسم) و هم به جهش‌های ایجاد شده در سایر نقاط (به جز Ile/Leu 1781) مربوط دانست. Delye ضمن آنکه مقاومت مبتنی بر محل هدف را مهمترین مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase می‌داند، نقش متابولیسم در مقاوم شدن علف‌های هرز باریک برگ نسبت به این علف‌کش‌ها را نیز منتفی نمی‌داند (Delye, 2005).

مقایسه نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی در خونی واش (*Phalaris spp.*)

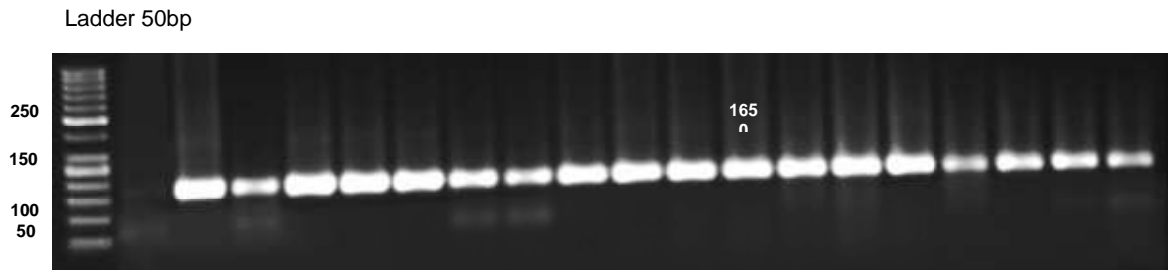
بر اساس نتایج آزمایشات گلخانه‌ای انجام شده بر روی ۳۳ بیوتیپ خونی واش جمع آوری شده از استان‌های خوزستان، فارس و گلستان، ۱۵ بیوتیپ مقاوم، ۱۷ بیوتیپ احتمالا مقاوم و ۱ بیوتیپ نیز حساس به علف‌کش‌های بازدارنده ستر اسیدهای چرب است. آزمایشات مولکولی انجام شده بر روی بیوتیپ‌های فوق نشان دهنده وجود ۲۵ بیوتیپ مقاوم (۳ بیوتیپ RR و ۲۲ بیوتیپ RS) و ۸ بیوتیپ حساس بود. با مقایسه نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی مشخص شد که چنانچه توده‌هایی که در آزمایش گلخانه‌ای احتمالا مقاوم شناخته شده اند را نیز توده‌های مقاوم بدانیم (Moss et al., 2007)، نتایج آزمایش مولکولی ۷۸٪ مشابه نتایج آزمایش گلخانه‌ای است. عدم همخوانی بین نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی را می‌توان به جهش‌های ایجاد شده در سایر نقاط (به جز Ile/1781/Lue) مربوط دانست (Delye, 2005).

طریق روش کشت گیاه کامل در گلدان، مطالعه شده بود (Zand et al., 2009) آورده شده است. همانطور که در مواد و روش ذکر شد، برای تعیین توده‌های مقاوم از روش ادکینز و همکاران (Adkins et al., 1997) استفاده شد.

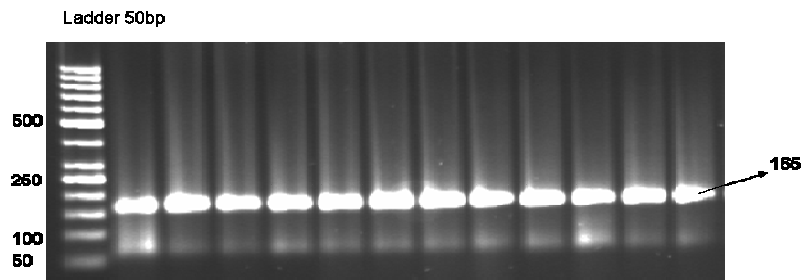
مقایسه نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی در یولاف وحشی (*Avena spp.*)

نتایج حاصل از آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که از ۳۰ بیوتیپ یولاف وحشی بررسی شده در استان‌های خوزستان، فارس و ایلام، ۱۰ بیوتیپ مقاوم، ۱۹ بیوتیپ احتمالا مقاوم و ۱ بیوتیپ حساس می‌باشند. بر اساس نظر موس و همکاران (Moss et al., 2007)، توده‌های احتمالا مقاوم در واقع همان توده‌های مقاومی هستند که مقاومت آنها بالاست، ولی احتمالاً اثر علف‌کش را کاهش می‌دهد.

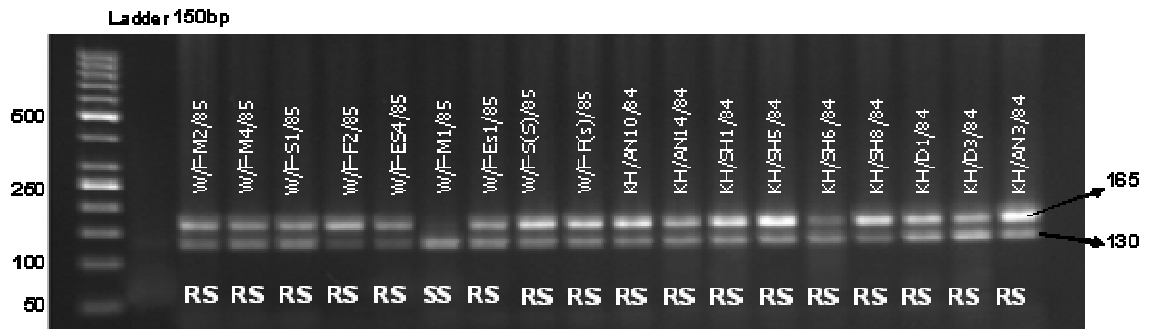
آزمایشات مولکولی انجام شده بر روی بیوتیپ‌های فوق نیز نشان دهنده وجود ۲۶ بیوتیپ مقاوم (RS) و ۴ بیوتیپ حساس (SS) است. چنانچه توده‌هایی که در آزمایش گلخانه‌ای احتمالا مقاوم شناخته شده‌اند را نیز توده‌های مقاوم بدانیم (Moss et al., 2007)، نتایج آزمایش مولکولی در سه مورد با نتایج آزمایش گلخانه‌ای همخوانی نخواهد داشت. به عبارتی نتایج آزمایش مولکولی در حدود ۹۰٪ مشابه نتایج آزمایش گلخانه‌ای است. این نتایج حاکی از آن است که پرایمر انتخاب شده برای این آزمایش که جهش ناشی از جانیشینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile/Leu 1781) را تعیین می‌کند، توانسته حدود ۹۰٪ از بیوتیپ‌های مقاوم را شناسایی کند و در ضمن جانیشینی لوسین به جای ایزولوسین را به عنوان مهم‌ترین مکانیزم مقاومت در بیوتیپ‌های مورد مطالعه معرفی



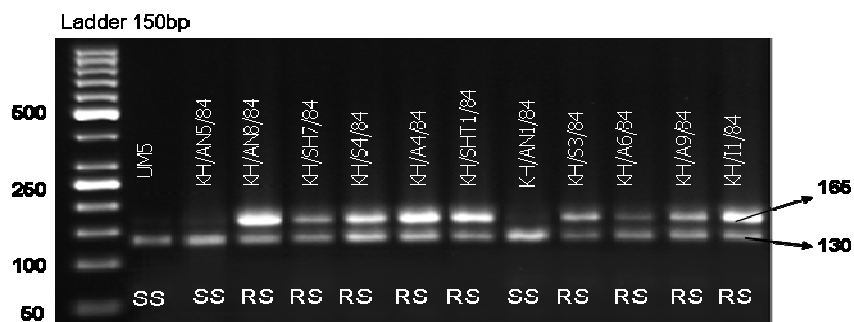
(A) الف



(B) ب



(C) ج



شکل ۱- نتایج حاصل از PCR (الف و ب) و برش آنزیمی (ج و د). (SS) بیوتیپ حساس و (RS) بیوتیپ هتروزایگوت مقاوم یولاف وحشی.

Figure 1- Results of PCR (A and B) and digestion (C and D). Susceptible biotype (SS) and Heterozygote and Resistance biotype (RS) of *Avena ludoviciana*.

مقایسه نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی در چچم (*Lolium spp.*)

در رابطه با علف هرز چچم جمع آوری شده از استان فارس در آزمایشات گلخانه‌ای از بین ۶ بیوتیپ مورد بررسی ۱ بیوتیپ مقاوم و ۵ بیوتیپ احتمالا مقاوم بودند و بیوتیپ حساسی مشاهده نشد. نتایج آزمایشات مولکولی این بیوتیپ ها نشان دهنده وجود ۶ بیوتیپ مقاوم (۶ بیوتیپ RS) بود. در مورد این علف هرز نیز چنانچه توده‌هایی که در آزمایش گلخانه‌ای احتمالا مقاوم شناخته شده‌اند را نیز توده‌های مقاوم بدانیم (Moss et al., 2007)، نتایج آزمایش گلخانه‌ای ۱۰۰٪ مشابه نتایج آزمایش مولکولی است.

مقایسه کلی نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی

در کل از ۶۹ توده مورد بررسی، نتایج آزمایش مولکولی و گلخانه‌ای در ۱۰ توده با هم همخوانی نداشت، به عبارتی با استفاده از پرایمر تعیین کننده بروز جهش در نقطه ۱۷۸۱ (Ile/Leu 1781) می‌توان با ۸۵٪ اطمینان بروز مقاومت را تعیین نمود. باید توجه داشت که در برخی علف‌های هرز مثل یولاف وحشی و چچم نسبت به خونی واش همخوانی بیشتری بین نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی بود که جای بررسی بیشتر دارد. حدود ۱۵٪ عدم همخوانی بین نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی را می‌توان هم به مکانیزم مقاومت مبتنی بر غیر محل هدف (افزایش متابولیسم) و هم به جهش‌های ایجاد شده در سایر نقاط (به جز Ile/Leu 1781) مربوط دانست.

مکانیزم مقاومت به علفکش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز به چهار صورت امکان پذیر است: اول حضور آنزیم هدف غیر حساس در گونه مقاوم که از طریق یک جهش ساده نیمه غالب در ژن ساختاری ACCase ایجاد می شود، دوم ایجاد جهش در غشاء گونه مقاوم که سبب قطبی شدن مجدد غشاء پس از القای حالت غیر قطبی از سوی علفکش‌های بازدارنده ACCase، سوم اختلاف در متابولیسم علفکش در پیکر گیاه مقاوم و حساس و چهارم تولید آنزیم

ACCase برای جبران آنزیم مختل شده از سوی علفکش در گونه‌های مقاوم (Delye & Michel, 2005; Kaundun & Windass, 2006). (Michel, 2005).

هر چند مکانیزم مقاومت به علفکش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز به چهار صورت فوق امکان پذیر است، ولی در بیشتر تحقیقات غیر حساس شدن آنزیم هدف به علفکش‌های بازدارنده ACCase بعنوان مکانیزم اصلی شناخته شده است (Delye & Michel, 2005; Kaundun & Windass, 2006). و از این رو تفاوت در نوع مکانیزم مقاومت از جمله مواردی است که در آینده باید مورد مطالعه قرار گیرد.

بر اساس مکانیزم اول که یک جهش ساده می‌تواند باعث بروز مقاومت شود، تاکنون برای مقاومت به علفکش‌های بازدارنده ACCase چندین جهش گزارش شده است که مهم‌ترین آنها شامل جایگزینی سیستئین به جای تریپتوفان در جایگاه ۲۰۲۷ و ۱۹۹۹، جایگزینی اسپارژین به جای ایزولوسین در جایگاه ۲۰۴۱، جایگزینی آلانین به جای گلایسین در جایگاه ۲۰۹۶ و جایگزینی گلایسین به جای اسپارتیک اسید با در جایگاه ۲۰۷۸ می‌باشد (Delye, 2005) که برای تعیین آنها باید از پرایمرهای خاص استفاده نمود. البته از آنجا که جهش غالب جایگزینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile/Leu 1781) است (Perston, 2003) و این موضوع در این آزمایش نیز تایید شده است، بنابراین برای استفاده گسترده از روش‌های مولکولی برای تعیین مقاومت، مقرون به صرفه ترین پرایمر، پرایمری است که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفته است.

Perston جایگزینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile/Leu 1781) و جایگزینی تریپتوفان با سیستئین در جایگاه ۲۰۲۷ (Try/Sys) را مهمترین مکانیزم مقاومت در بیوتیپ‌های مقاوم ذکر کرده‌اند و عنوان کرده‌اند که دلیل مشخصی تا کنون برای این امر تشخیص داده نشده است (Perston, 2003).

در نهایت مقایسه نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و مولکولی بیانگر آن است که با اندکی خطا (حدود ۱۵٪) می‌توان مقاومت

عمده‌ترین مکانیزم مقاومت به این گروه از علف‌کش‌ها مقاومت مبتنی بر تغییر محل هدف است که از طریق موتاسیون در ژن‌های کد کننده ACCase کلروپلاستی و بخصوص جایگزینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile /Leu) (1781) اتفاق می‌افتد (Delye & Michel, 2005).

مواردی که در آزمایش گلخانه‌ای فنوتیپ مقاوم (RRR) بود، ولی در کار مولکولی بصورت هتروزایگوت (RS) خود را نشان داد، احتمالاً به این دلیل است که بروز جهش در مکان‌های ژنی دیگر علاوه بر مکان‌های ژنی ۱۷۸۱ صورت گرفته است. بنابراین نیاز به آزمایش‌های تکمیلی دقیق تر و بیشتر برای مطالعه سایر مکان‌ها است.

علف‌های هرز به علف‌کش‌های بازدارنده‌های ACCase را با استفاده از روش مولکولی تشخیص داد. در حال حاضر یکی از دقیق‌ترین و سریع‌ترین روش‌های تشخیص بیوتیپ‌های مقاوم به علف‌کش، استفاده از روش تشخیص مبتنی بر DNA است (Corbett & Tardif, 2006). این روش که بسیار سریع و آسان است، فقط قادر به تشخیص جمعیت‌های مقاومی است که مکانیزم مقاومت آنها تغییر محل عمل است. به عبارت دیگر جمعیت‌های که مکانیزم عمل آنها غیر از تغییر محل عمل است را نمی‌توان با این روش شناسایی نمود (Corbett & Tardif, 2006; Delye et al., 2002). تحقیقات اخیر حاکی از آن است که هرچند مقاومت به بازدارنده‌های ACCase ممکن است به دلیل افزایش متابولیسم نیز اتفاق بیافتد، ولی

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و مولکولی در گونه‌های *Lolium* و *Phalaris paradoxa*, *P. Minor*, *P. Brachystachys*, *Avena ludoviciana* و *Lolium multiflorum*.

Table 1- Results of Glass-house and digestion in *Phalaris paradoxa*, *P. Minor*, *P. Brachystachys*, *Avena ludoviciana* and *Lolium multiflorum*.

Results of digestions**	Results of Glass-house experiments*	City	Species	Code	Province	
RS	RRR	Dezful	<i>Phalaris paradoxa</i>	C/KH-D/84	Khuzestan	
RS	RRR	Shush	<i>Phalaris minor</i>	C/KH SH1/84		
RR	RRR	Shush	<i>Phalaris paradoxa</i>	C/KH-SH/85		
RS	RR	Sousangerd	<i>Phalaris brachystachys</i>	C/KH-S2/84		
RS	RR	Shushtar	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-SHT/84		
RS	RR	Ahvaz	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-A1/84		
RS	RR	Ahvaz	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-A3/84		
RS	RR	Ahvaz	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-A4/84		
SS	RRR	Ahvaz	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-A7/84		
SS	RRR	Ramhormoz	<i>Phalaris brachystachys</i>	C/KH-R/84		
RS	RRR	Ahvaz	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-A5/84		
RS	RRR	Andimeshk	<i>Phalaris minor</i>	C/KH-AN(S)/84		
RS	RR	Fasa	<i>Phalaris brachystachys</i>	C/F-F1/85		Fars
RR	RRR	Fasa	<i>Phalaris minor</i>	C/F-F3/85		
RS	RR	Fasa	<i>Phalaris minor</i>	C/F-F4/85		
RS	RR	Shiraz	<i>Phalaris minor</i>	C/F-SH2/85		
RS	RR	Fasa	<i>Phalaris brachystachys</i>	C/F-F2/85		
RR	RR	Shiraz	<i>Phalaris minor</i>	C/F-SH1/85		
SS	RR	Fasa	<i>Phalaris minor</i>	C/F-F(s)/85		
RS	RR	Estahban	<i>Phalaris minor</i>	C/F-ES2/85		
SS	RR	Estahban	<i>Phalaris minor</i>	C/F-ES(S)/85		
RS	RR	Marvdasht	<i>Phalaris minor</i>	C/F-M1/85		
SS	RR	Marvdasht	<i>Phalaris minor</i>	C/F-M2/85	Golestan	
RS	RRR	Marvdasht	<i>Phalaris minor</i>	C/F-M (s)/85		
SS	RRR	Gorgan	<i>Phalaris minor</i>	C/G1/85		
RS	RRR	Kordkoy	<i>Phalaris minor</i>	C/G3/85		
RS	RRR	Gorgan	<i>Phalaris minor</i>	C/G4/85		
SS	RRR	Gorgan	<i>Phalaris minor</i>	C/G5/85		
RS	RR	Gorgan	<i>Phalaris minor</i>	C/G6/85		
RS	RR	Aliabad	<i>Phalaris minor</i>	C/G7/85		
SS	S	Aliabad	<i>Phalaris minor</i>	C/G8/85		
RS	RRR	Aliabad	<i>Phalaris minor</i>	C/G10/85		

Results of digestions**	Results of Glass-house experiments*	City	Species	Code	Province
RS	RRR	Gorgan	<i>Phalaris minor</i>	C/G(S)/85	
RS	RRR	Marvdasht	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-M 2/85	Fars
RS	RRR	Marvdasht	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-M 4/85	
RS	RRR	Sepidan	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-S 1/85	
RS	RR	Fasa	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F- F2/85	
RS	RR	Estahban	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-ES 4/85	
SS	RR	Marvdasht	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-M 1/85	
RS	RR	Estahban	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-ES 1/85	
RS	RR	Sepidan	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-S(S)/85	
SS	RR	Fasa	<i>Avena ludoviciana</i>	W/F-F(S)/85	
RS	RR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN10/84	
RS	RR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN14/84	
SR	RR	Shush	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SH1/84	
SR	RR	Shush	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SH5/84	
RS	RR	Shush	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SH6/84	
RS	RR	Shush	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SH8/84	
RS	RRR	Dezful	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-D1/84	
RS	RRR	Dezful	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-D3/84	
RS	RRR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN3/84	
SS	RR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN5/84	
RS	RR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN8/84	
RR	RRR	Shush	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SH7/84	
RS	RR	Sousangerd	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-S4/84	
RS	RR	Ahvaz	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-A4/84	
RS	RR	Shushtar	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-SHT1/84	
SS	RRR	Andimeshk	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-AN1/84	
SS	RRR	Bostan	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-S3/84	
RS	RRR	Ahvaz	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-A6/84	
RS	RR	Ahvaz	<i>Avena ludoviciana</i>	W/KH-A9/84	
RR	RR	Ilam	<i>Avena ludoviciana</i>	W/ I 1/85	Ilam
SS	S	Canad	<i>Avena ludoviciana</i>	Um5	Susceptible control
RS	RRR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F4/85	Fars
RS	RR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F6/85	
RS	RR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F8/85	
RS	RR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F1/85	
RS	RR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F2/85	
RS	RR	Shiraz	<i>Lolium multiflorum</i>	R/F(s)/85	

RRR*: Resistant, RR:Probability resistant and S: Susceptible (Moss et al., 2007).

RS**: Heterozygot resistant (I1781L) and SS: Susceptible (I1781I)

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. 2007. Introduction to the symposium grass weed resistance: Fighting back. *Weed Technol.* 21: 289.

BenaKashani, F., Mohammad Alizadeh, H. and Zand, E. 2007. Investigation the resistance of wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu) to fenoxaprop-p-ethyl whole plant bioassay and seed bioassay. *Pakistan J Bio Sci.* 10: 72- 77.

Boutsalis, P. 2001. Syngenta quick test: A rapid whole-plant test for herbicide resistance. *Weed Technol.* 15: 257-263.

- Cirujeda, A., Recasens, J. and Taberner, A. A. 2001. A quantitative quick-test for detection of herbicide resistance to tribenuron-methyle in *Papaver rhoeas*. Weed Res. 41: 523-534.
- 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.
- Delye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: An update. Weed Sci. 53: 728-764.
- Delye, C. and Michel, S. 2005. Universal primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domain involved in resistance to herbicide. Weed Res. 45: 323-330.
- Delye, C., Matejcek, A. and Gasquez, J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). Pest Manage Sci. 58: 474-478.
- Heap, I. 2011. International survey of herbicide resistance weeds. Online Internet. 1 September 2011. Available. www.weedscience.com.
- 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.
- 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.
- Patzoldt, W. L. and Tranel, P. J. 2002. Molecular analysis of cloransulam resistance in a population of giant ragweed. Weed Sci. 50: 299-305.
- Perston, C. 2003. Herbicide resistance: Target site mutation. In: Weedy and Invasive Plant Genomics. eds. Stewart Jr, C. N. Wiley-Blackwell. Pp.127-148.
- Wan Kang, H., Yong, G. C., Ung, H. Y. and Moo, Y. E. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Mol Biol Rep. 16: 1-9.
- Zand, E., Bena Kashani, F., Alizadeh, H. M., Soufizadeh, S., Ramezani, K., Maknali, A. and Fereidounpoor, M. 2006. Resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in wild oat (*Avena Ludoviciana*). Iran J Weed Sci. 2:17-32.
- Zand, E., Bena Kashani, F., Baghestani, M. A., Maknali, A., Minbashi, M. and Soufizadeh, S. 2007. Investigating the distribution of resistant wild oat (*Avena ludoviciana*) populations to clodinafop-propargil herbicide in south western Iran. Environ Sci. 3: 85-92.
- Zand, E., Bena Kashani, F., Soufizadeh, S., Ebrahimi, M., Minbashi, M., Dastaran, F., Poorbayge, M., Jamali, M., Maknali, A., Younesabadi, M., Deihimfard, R. and Forouzes, S. 2009. Study on the Resistance of Problematic Grass Weed Species to Clodinafop Propargyl in Wheat in Iran. Environ Sci. 6:145-160.

Comparison of Resistance of Grass Weeds to Clodinafop-Propargyl Using Glass-House and Molecular Methods

Eskandar Zand¹, Arash Razmi¹, Fatemeh Benakashani¹, Fahimeh Nazari¹, Mehdi Rastgoo²

1- Weed Research Department of Iranian Research Institute of Plant Protection 2- Ferdowsi university of mashhad

Abstract

In order to evaluate the efficacy of molecular method to detect the resistance of weeds to herbicides, 69 resistant or susceptible grass weed biotypes to clodinafop propargyl herbicide, including *Lolium* spp. (6 biotype), *Avena* spp. (30 biotype), and *Phalaris* spp. (33 biotype) were studied, dCAPS method as a simple method to diagnosis Ile1781Leu amino acid substitution in ACCase enzyme was used. The results of greenhouse experiment for *Avena* spp., *Phalaris* spp. and *Lolium* spp. were 90%, 79% and 100% similar to molecular experiment respectively. In general, the similarity of molecular method with current methods was about 85%. Isoleucine (Ile) to leucine (Lue) substitution at position 1781 (Ile /Leu) was the most common amino acid substitution selected with ACCase-inhibiting herbicide. The partial differences (about 15%) between glass-house and molecular methods also can explain by non-target site mechanism (enhancing metabolism) or another amino acid substitution.

Key words: Resistance, Acetyl coA carboxylase, dCAPS method.