

استفاده از روش‌های CAPS و dCAPS در تشخیص برخی جهش‌های منجر به مقاومت یولاف

وحشی (*Avena ludoviciana*) به علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز

اسکندر زند^{۱*}، آرش رزمی^۲، فاطمه بناء کاشانی^۳، نوشین نظام آبادی^۲، جاوید قرخلو^۴ و حمید رضا ساسان‌فر^۲

۱- عضو هیات علمی بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه گیاه پزشکی کشور، ۲- محقق بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، ۳- عضو هیات علمی پژوهشکده فناوری و مهندسی زیستی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۴- عضو هیات علمی دانشگاه کشاورزی گرگان

چکیده

کاربرد مداوم علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز برای کنترل علف‌های هرز باریک‌برگ‌های مشکل‌ساز در مزارع گندم کشور منجر به بروز مقاومت در ۵ گونه از علف‌های هرز باریک‌برگ شده است. اخیراً بیوتیپ‌هایی از علف هرز یولاف وحشی مقاوم به علف‌کش کلودینافوپ پروپارژیل، ستوکسیدیم و پینوکسادن مورد شناسایی قرار گرفته که دارای شاخص مقاومتی بین ۱/۳۱ تا بیش از ۵۰/۶۳ در برابر بازدارنده‌های ACCase بودند. در این آزمایش اساس ملکولی مقاومت در بیوتیپ‌های مقاوم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از روش‌های CAPS و dCAPS برای شناسایی جهش‌های احتمالی که در نقاط ۱۷۸۱، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase رخ داده و باعث مقاومت یولاف وحشی به علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز شده‌اند، استفاده شد. نتایج نشان داد که علت مقاومت در ۵۰ درصد بیوتیپ (شامل بیوتیپ‌های M4، S2، S3، S4 و ES1) جهش در موقعیت ۱۷۸۱، در ۱۰ درصد بیوتیپ‌ها (شامل بیوتیپ M2) جهش در موقعیت ۲۰۴۱ و در ۱۰ درصد بیوتیپ‌ها (شامل بیوتیپ M4) جهش در دو جایگاه ۱۷۸۱ و ۲۰۷۸ کربوکسیل ترانسفراز آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز بود. در مجموع ۷۰ درصد بیوتیپ‌های مقاوم حداقل در یکی از نقاط ۱۷۸۱، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ جهش داشتند و در هیچ یک از بیوتیپ‌های مورد مطالعه جهش در موقعیت ۲۰۸۸ مشاهده نشد. در سایر بیوتیپ‌های مقاوم، احتمالاً جهش در نقطه دیگری از ژن کدکننده آنزیم ACCase رخ داده و یا مکانیزم مقاومت آنها مبتنی بر غیر هدف می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم برشی، پینوکسادن، ستوکسیدیم، کلودینافوپ پروپارژیل

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

مقدمه

علفکش‌ها دارای فعالیت علف‌کشی می باشد. هیدرولیز سبب رهاسازی اسید می‌شود. حال در گیاهان هرز که این علفکش عمل می‌کند (گیاهان حساس) سرعت هیدرولیز استر بالاست ولی علف کش در گیاه متحمل از طریق هیدروکسیلاسیون و الحاق قند متابوله و به مواد غیر فعال تبدیل می شود (Délye, 2005).

کاربرد متوالی این علف کش در مزارع گندم منجر به تکامل بیوتیپ‌های مقاوم علف‌های هرز باریک‌برگی مانند یولاف وحشی (*Avena spp.*)، چچم (*Lolium spp.*) و فالاریس (*Phalaris spp.*) نسبت به این علف کش شده است. در اغلب موارد جهش‌های نقطه‌ای علت بروز این مقاومت هستند، بطوری که تغییر یک نوکلئوتید در ژن کد کننده آنزیم ACCase باعث تغییر در رشته آمینو اسیدی پروتئین و آنزیم هدف شده و این موضوع توانایی علف‌کش برای مقابله یا اتصال با آن پروتئین را کاهش داده و یا از بین می‌برد (Mallory-Smith & Namuth, 2006). مطالعات نشان داده که تغییر در ۷ آمینو اسید در توالی ژن کدکننده پروتئین ACCase پلاستییدی گراس‌ها باعث مقاومت بالا به بازدارنده‌های گروه ACCase می‌شود. جدول ۱ آمینو اسیدهای بیوتیپ وحشی یا حساس و بیوتیپ مقاوم یا جهش یافته و جایگاه‌های آنها را در ۷ نقطه از توالی آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز در دم روباهی کشیده (*Alopecurus myosuroides* Huds.) نشان می‌دهد که غیر از Ile178Ile سایر جایگزینی‌ها در یک ناحیه ۱۰۰ آمینو اسیدی قرار دارند. به دلیل تشابه توالی آمینو اسیدهای تشکیل دهنده پروتئین استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز بین گراس‌های مختلف، هر گونه استخلاف در نقاط یاد شده در جدول ۱ باعث بروز مقاومت در آنزیم ACCase علف‌های هرز باریک‌برگ به بازدارنده‌های ACCase می‌شود.

استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (ACCase, EC 6.4.1.2) آنزیمی کلیدی در اولین مرحله از بیوسنتز اسیدهای چرب در گیاهان و آنزیمی هدف برای علف‌کش‌های بازدارنده ACCase می‌باشد. بازدارنده‌های ACCase شامل سه گروه مهم از علف-کش با نام‌های آریلوکسی‌فنوکسی‌پروپیونات (APP)، سیکلوهگزاندیون (CHD) و فنیل پیرازولین (DEN) هستند که به ترتیب به آنها علف‌کش‌های "فوپ‌ها"، "دیم‌ها" و "دن‌ها" نیز گفته می‌شود (Délye, 2005).

در گیاهان دو ایزوفرم از ACCase شامل ایزوفرم پلاستییدی (سنتز کننده اسیدهای چرب اولیه) و ایزوفرم سیتوزولی (سنتز کننده اسیدهای چرب با زنجیره بلند) وجود دارد. در گونه‌های گیاهی دولپه ایزوفرم پلاستییدی آنزیمی هترومیک ولی ایزوفرم موجود در سیتوزول همه گیاهان و در پلاستیدها و میتوکندری خانواده گندمیان، آنزیمی همومیک می‌باشد. ایزوفرم هترومیک پلاستییدی موجود در گونه‌های دو لپه نسبت به بازدارنده‌های ACCase غیر حساس، ولی ایزوفرم همومیک پلاستییدی گراس‌ها کاملاً حساس می‌باشد. از این خاصیت می‌توان جهت کنترل انتخابی علف‌های هرز باریک برگ بخصوص یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu) در مزارع گندم استفاده کرد. در باریک‌برگ‌هایی نظیر گندم، ذرت و برنج که دارای ایزوفرم همومیک حساس در پلاستید می‌باشند، خاصیت انتخابی برای علف‌کش‌های خانواده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات به دلیل بالا بودن سرعت هیدرولیز فرم استری علف‌کش‌های یاد شده است. این علف‌کش معمولاً به صورت پیش‌علف‌کش (استرهای کربوکسیلیک اسید) بکار می‌روند که پس از ورود به گیاه پیوند استر توسط آنزیم استراز، هیدرولیز می‌شود. شکل اسیدی این

جدول ۱- جایگزینی اسیدهای آمینه شناسایی شده در توالی پروتئین ACCase همومریک پلاستییدی *A. myosuroides*Table 1- Distinct amino acids replacement in the plastidic homomeric ACCase of *A. myosuroides*

Reference	Amino acid residue	
	Mutant-type	Wild-type
Delye <i>et al.</i> , 2002	Leu	Ile ¹⁷⁸¹
Delye <i>et al.</i> , 2005	Cys	Trp ²⁰²⁷
Delye <i>et al.</i> , 2003	Asn	Ile ²⁰⁴¹
Delye <i>et al.</i> , 2005	Gly	ASP ²⁰⁷⁸
Delye <i>et al.</i> , 2005	Ala	Gly ²⁰⁹⁶
Yu <i>et al.</i> , 2007a	Arg	Cys ²⁰⁸⁸
Lui <i>et al.</i> , 2007	Cys	Trp ¹⁹⁹⁹

ژن کدکننده آنزیم ACCase بهره جسته شده است. (Rastgoo, 2007) با استفاده از این روش بروز جهش در جایگاه ۱۷۸۱ و جایگزینی ایزولوسین با لوسین را دلیل مقاومت بیوتیپ‌های یولاف وحشی به علفکش کلودینافوپ پروپارژیل دانسته است. زند و همکاران (Zand *et al.*, 2010b) به منظور ارزیابی کارایی روش dCAPS برای تشخیص علف‌های هرز مقاوم به علفکش، ۶۹ بیوتیپ از علف‌های هرز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*)، فالاریس (*Phalaris minor* Retz.; *P. paradoxa* L.; *P. brachystachys* Link) و چچم (*Lolium multiflorum* Lam.) مقاوم و حساس به علفکش کلودینافوپ پروپارژیل مورد آزمایش قرار دادند. در این آزمایش جانشینی لوسین به جای ایزولوسین (Ile1781Leu) به عنوان مهم‌ترین مکانیزم مقاومت در بیوتیپ‌های مورد مطالعه شناخته شد. قرحلو (Gherekhloo, 2008)، مبنای ملکولی مقاومت در توده‌های فالاریس (*P. minor*) را با روش dCAPS مورد مطالعه قرار داده و گزارش کرد که توده‌های مقاوم در نقطه ۱۷۸۱ ناحیه اول ژن کدکننده دچار جهش نشده‌اند. دستوری (Dastoori, 2011)، نیز با بهره‌گیری از روش dCAPS، جانشین شدن اسید آمینه لوسین بجای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ در محل اتصال کننده کربوکسیل ترانسفراز (CT) استیل کوآنزیم آ پلاستییدی را یک جهش نقطه‌ای کلیدی ایجاد کننده مقاومت در چچم (Gaudin *Lolium rigidum*) به اغلب علف‌کش‌های فوپ و دیم گزارش کرده است. زند و همکاران (Zand *et al.*, 2009)، در آزمایش دیگری از روش dCAPS برای تشخیص جهش در موقعیت

در بسیاری از تحقیقات از روش‌های مبتنی بر DNA، مانند CAPS^۱ (Konieczny & Ausubel, 1993) و dCAPS^۲ (Nef *et al.*, 1998) برای تشخیص بیوتیپ‌های مقاوم به علفکش و همچنین تشخیص مکانیزم‌های مقاومت به علفکش استفاده شده است. در تکنیک CAPS، ابتدا قطعه مورد نظر DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شده و سپس محصول آن تحت تاثیر آنزیم‌های برشی قرار می‌گیرد. این تکنیک قادر به شناسایی تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی و یا SNP^۳ هایی است که در محل شناسایی آنزیم‌های برشی رخ داده و باعث حذف یک مکان برشی یا ایجاد مکان برشی جدیدی می‌شوند. از محدودیت‌های این روش می‌توان به عدم شناسایی جهش‌هایی که در خارج از محل برش آنزیم اتفاق می‌افتد، اشاره کرد. برای حل این مشکل از روش dCAPS استفاده می‌شود. در روش dCAPS با استفاده از پرایمرهایی که در آنها یک یا چند نوکلئوتید جهش یافته نسبت به DNA الگو طراحی شده است، یک جایگاه برشی (حاوی SNP) در محصول PCR ایجاد می‌شود. سپس محصول PCR تحت تاثیر آنزیم‌های برشی قرار گرفته و حضور یا عدم حضور SNP ها مورد بررسی قرار می‌گیرد (Konieczny & Ausubel, 1993; Nef *et al.*, 1998).

در ایران بروز مقاومت در ۵ گونه از گیاهان هرز باریک‌برگ به بازدارنده‌های ACCase گزارش شده است (Gherekhloo & Zand, 2010)، که در برخی از مطالعات انجام شده از روش dCAPS برای شناسایی جهش رخ داده در ناحیه اول

¹- Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

²- Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

³- Single Nucleotide Polymorphisms

این تحقیق به منظور استفاده از روش های CAPS و dCAPS برای شناسایی جهش های احتمالی که در نقاط ۱۷۸۱، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase رخ داده و باعث مقاومت یولاف وحشی به علف کش های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز شده اند، انجام شد.

مواد و روش ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در بخش تحقیقات علف های هرز موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور به شرح زیر انجام شد.

مواد آزمایشی: مواد گیاهی این پژوهش شامل ۲ توده حساس و ۱۰ توده یولاف وحشی مقاوم به برخی از بازدارنده های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز بود (جدول ۲) که در آزمایش های قبلی از طریق روش های زیست سنجی گلدانی، درجه مقاومت آنها به سه علف کش کلودینافوپ پروپارژیل (تاپیک)، ستوکسیدیم (نابو-اس) و پینوکسادن (آکسیال) تعیین شده بود (Sasanfar et al., 2009a,b).

۱۷۸۱ (Ile1781Leu) و ۲۰۴۱ (Ile2041Asn) ژن کدکننده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز استفاده کردند. نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که از بین ۱۷ توده یولاف وحشی مقاوم به علف کش، علت مقاومت ۸ توده (۴۴ درصد از توده های مورد مطالعه) جهش در موقعیت ۱۷۸۱ بود و در هیچ یک از توده ها جهش در موقعیت ۲۰۴۱ مشاهده نشد. بناء کاشانی (Bena Kashani, 2011)، نیز به منظور تشخیص مکانیزم احتمالی مقاومت بر اساس محل عمل، یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) و چهار جهش مختلف در محل کربوکسیل ترانسفراز آنزیم ACCase، از روش های مولکولی CAPS و dCAPS استفاده کرد. نتایج حاصل از آزمایش ها نشان داد که ۵۳/۸ درصد بیوتیپ های مقاوم یولاف وحشی دارای جهش ایزولوسین-۱۷۸۱-لوسین و ۷/۶ درصد بیوتیپ ها دارای جهش اسپارتیک اسید-۲۰۷۸-گلیسین می باشند. بروز جهش ژنتیکی در جایگاه های ۲۰۲۷ و ۲۰۷۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase در توده های فالاریس مقاوم به APP نیز با استفاده از روش پایروسکوئینسینگ گزارش شده است (Gherekhloo et al., 2008).

جدول ۲- شاخص مقاومت بدست آمده بر اساس داده های وزن خشک و تعداد بوته زنده مانده بیوتیپ های مقاوم یولاف وحشی در زیست سنجی گلدانی با علف کشی کلودینافوپ پروپارژیل (تاپیک)، ستوکسیدیم (نابو-اس) و پینوکسادن (آکسیال) (Sasanfar et al., 2009a,b).

Table 2- R/S ratio based on dry weight and number of survival plant of resistant wild oat in whole plant assay treated with Clodinafop-propargyl (Topik), Setoxydim (Nabu-S) and Pinaxaden (Axial). (Sasanfar et al. 2009).

Biotype	Location	Clodinafop-propargyl		Setoxydim		Pinoxaden	
		R/S Dry weight	R/S Number of Survival plant	R/S Dry weight	R/S Number of Survival plant	R/S Dry weight	R/S Number of Survival plant
M1	Marvdasht	7.56	5.94	2.10	1.30	6.43	13.46
M2	Marvdasht	>34.07	>50.63	2.72	1.58	0.28	0.16
M3	Marvdasht	>34.07	6.42	3.22	1.52	6.47	5.40
M4	Marvdasht	34.07	3.23	4.87	2.91	0.90	1.94
F3	Fasa	20.74	50.63	7.25	3.70	3.58	2.33
S1	Sepidan	6.77	22.26	1.71	1.58	1.01	1.78
S2	Sepidan	4.17	1.59	6.60	2.46	27.81	14.26
S3	Sepidan	10.27	1.18	2.33	1.06	2.21	1.43
S4	Sepidan	6.81	2.57	6.14	2.99	26.89	15.49
ES1	Estahban	1.53	1.31	1.17	0.93	0.38	0.91
WL3							
DA3							

Susceptible biotypes (Control)

DNA به خوبی تهنشین شود. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نموده و فاز فوقانی را با احتیاط بیرون ریخته و رسوب DNA را با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و DNA خشک شده در فضای اتاق در ۱۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید.

تعیین کیفیت و کمیت DNA: ارزیابی کمی DNA های استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و از نسبت طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تعیین خلوص DNA های استخراج شده استفاده شد. برای اینکه مشخص شود DNA سالم بوده و شکستگی ندارد، مقدار ۲ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. در نهایت DNA هایی انتخاب شدند که بر روی ژل آگارز تشکیل یک باند واضح در بالای ژل دادند که نشان از کیفیت مناسب DNA استخراج شده داشت. بعد از این مرحله DNA ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شده و برای واکنش PCR استفاده شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز: واکنش PCR با کمک ترمال سایکلر Bio Rad در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی یک میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) با غلظت ۵ میکرومولار، یک میکرولیتر از ۵۰ Mg Cl₂ میلی مولار، ۰/۱ میکرولیتر از dNTP mix ۲۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر از 10XPCR buffer (بدون Mg Cl₂)، ۲ میکرولیتر از DNA 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 ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل خود از سه مرحله مجزا شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه

برای تهیه نمونه برگ تازه برای استخراج DNA بذور یولاف وحشی در گلخانه کشت شد و در مرحله ۲ تا ۳ برگی (۳ تا ۴ هفته بعد از کاشت)، گیاهچه‌ها با دستگاه سم‌پاش ثابت با نازل متحرک و توسط نازل بادبزی یکنواخت با دز توصیه شده علف کش تایپیک به میزان ۰/۸ لیتر در هکتار، معادل ۶۴ گرم ماده موثره کلودینافوپ پروپارژیل در هکتار مورد سم‌پاشی قرار گرفتند (Zand et al., 2010a). کلیه بیوتیپ‌ها بجز توده‌های حساس، به صورت ۱۰۰ درصد به این علف‌کش مقاومت نشان دادند. بعد از اطمینان از مقاومت بیوتیپ‌ها به این علف‌کش، از آنها برای نمونه‌گیری برگ جهت استخراج DNA استفاده شد.

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA از برگ گیاه کامل از روش CTAB^۱ (Cullings, 1992) با اندکی تغییرات استفاده شد. حدود ۰/۱۵ گرم از نمونه برگ در هاون چینی ریخته و با استفاده از نیتروژن مایع به پودر یکنواخت تبدیل گردید. ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج CTAB (۱۰ میلی لیتر از محلول Tris یک مولار با pH= ۸، ۲۸ میلی لیتر محلول NaCl ۵ مولار، ۴ میلی لیتر محلول EDTA^۲ ۰/۵ مولار و ۲ گرم CTAB با هم مخلوط شد و با آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.) و ۱/۸ میکرولیتر مرکاپتواتانول در داخل هر میکروتیوب حاوی پودر گیاه ریخته و تیوب‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ۱:۲۴ (کلروفرم: ایزوآمیل الکل) به تیوب‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از آن تیوب‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سوسپانسیون بالایی به تیوب‌های جدید منتقل گردید. معادل ۰/۱ حجم مایع داخل تیوب‌های جدید، استات آمونیوم سرد ۷/۵ مولار و بلافاصله هم حجم آن ایزوپروپانل سرد اضافه و تیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر -۲۰- نگهداری گردید تا

^۱- Cethyl three methyl ammonium bromide

^۲- Ethyl Disodium Tetra Acetate(EDTA)

تشکیل شده بود. آخرین مرحله شامل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. لازم به ذکر است که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو برای جفت پرایمر *NsiI1781f / NsiI1781r* (جدول ۳) ۶۰ درجه سانتی گراد بود.

جدول ۳- پرایمرهای استفاده شده در آزمایش

Table 3- Primers used in the experiment

Primer	Sequence 5'-3'	Usage	Reference
ACCF1	CACAGACCATGATGCAGCTC	CAPS for 2041 and 2088	Yu et al., 2007
ACCR1	CTCCCTGGAGTTGTGCTTTC	-	Yu et al., 2007
NsiI1781f	CTGTCTGAAGAAGACTATGGCCG	dCAPS for 1781	Kaundun and
NsiI1781r	AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGCA	-	Windass, 2006
EcoRV2078r	GCACTCAATGCGATCTGGATTATCTTGATA	dCAPS for 2078	Yu et al., 2007

بر این مطالعه از جفت پرایمر *NsiI1781f / NsiI1781r* برای شناسایی جایگزینی اسید آمینه لوسین بجای ایزولوسین در نقطه ۱۷۸۱ (Ile1781Leu)، از جفت پرایمرهای ACCF1/ACCR1 برای شناسایی جایگزینی آسپارژین بجای ایزولوسین در جایگاه ۲۰۴۱ (Ile2041Asn) و جایگزینی آرژنین بجای سیستئین در جایگاه ۲۰۸۸ (Cys2088Arg) و از جفت پرایمرهای ACCF1/EcoRV2078r برای شناسایی جایگزینی گلیسین بجای آسپارژین در جایگاه ۲۰۷۸ (Asp2078Gly) استفاده شد.

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 (جدول ۴) و ۱۸ میکرولیتر آب دیونیزه به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام و پس از آن محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TBE(0.5x) مورد الکتروفورز قرار گرفت.

جدول ۴- آنزیم های برشی استفاده شده در روش CAPS, dCAPS

Table 4- Restriction enzymes used in dCAPS/CAPS analysis

Enzyme	Commercial Isoschizomers	Restriction Site	Technique	Reference
NsiI	<i>AvaIII, EcoT22I, Mph11031, Zsp21</i>	5'-ATGCA [^] T-3' 3'-T [^] ACGTA-5'	dCAPS (1781)	Kaundun and Windass 2006
EcoRI	<i>FunII</i>	5'-G [^] AATTC-3' 3'-CTTAA [^] G-5'	CAPS (2041)	Yu et al., 2007
EcoRV	<i>Eco32I</i>	5'-GAT [^] ATC-3' 3'-CTA [^] TAG-5'	dCAPS (2078)	Yu et al., 2007
Eco47III	<i>AfeI, Aor51HI, FunI</i>	5'-AGC [^] GCT-3'	CAPS (2088)	Yu et al., 2007

۴۹۲bp، و گیاهان مقاوم هتروزیگوت (Ile/Asn) نیز هر سه باند فوق را نشان دهند (Yu et al., 2007). واکنش PCR با موفقیت انجام و باند مورد نظر ۴۹۲ جفت بازی در همه توده‌ها تکثیر شد (شکل ۱). نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR نشان داد که از میان بیوتیپ‌های مورد مطالعه، ژن کدکننده آنزیم ACCase بیوتیپ M2 در جایگاه ۲۰۴۱ دچار جهش شده و از آنجاییکه سه باند ۲۰۸، ۲۸۲ و ۴۹۲ جفت بازی تولید شده بود، این موضوع دلیل بر هتروزیگوت بودن بیوتیپ M2 بود. سایر بیوتیپ‌ها در این جایگاه دچار تغییری نشده بودند.

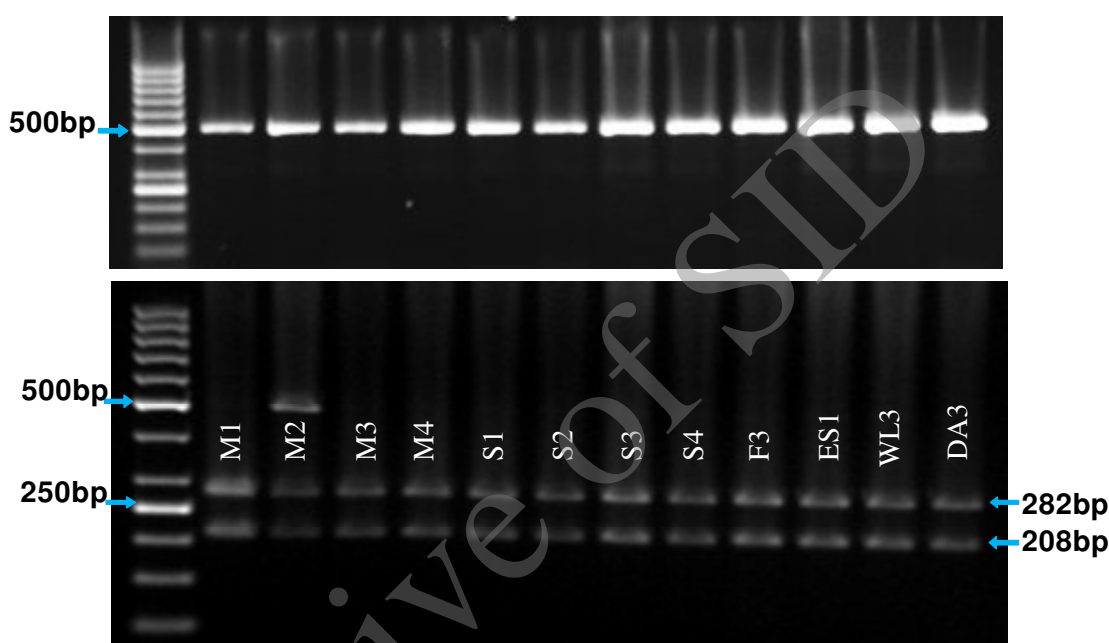
نتایج و بحث

نتایج مربوط به روش CAPS

جایگزینی A با T در کدون ۲۰۴۱ در ژن کدکننده ACCase پلاستییدی باعث تغییر آمینو اسید Ile به Asn و حذف محل برشی آنزیم *EcoRI* می‌شود (جدول ۴). از جفت پرایمرهای ACCF1/ACCR1 (جدول ۳) برای تکثیر قطعه ۴۹۲bp استفاده و انتظار می‌رود که پس از هضم با آنزیم *EcoRI* در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت، گیاهان حساس هموزیگوت (Ile/Ile) دو باند ۲۰۸، ۲۸۲ جفت بازی، گیاهان مقاوم هموزیگوت (Asn/Asn) باند هضم نشده

گزارش شده است. دیلی و همکاران (Delye et al., 2003)، جهش دیگری در نقطه ۲۰۴۱ و تبدیل ایزولوسیون و به والین را نیز در *L. rigidum* به عنوان یکی از دلایل مقاومت آنزیم ACCase در این گونه معرفی کرده اند.

دیلی و همکاران (Délye et al., 2003)، وجود جهش در نقطه ۲۰۴۱ آنزیم ACCase و تبدیل اسید آمینه ایزولوسیون به آسپاراژین را در *A. myosuroides* گزارش کرده اند. همچنین این جهش در گیاهان مقاوم (Délye et al., 2003) (*Avena sterilis* L., *L. rigidum*) (Liu et al., 2007)

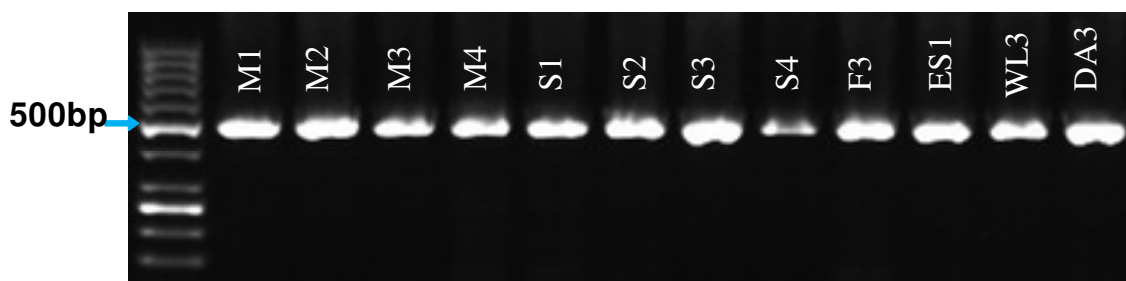


شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR و تشکیل باند 492 bp (شکل بالا) و نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ های یولاف وحشی *A. ludoviciana* با استفاده از آنزیم برشی EcoRI (شکل پایین)

Figure 1-Results of PCR (up) and enzyme digestion of *A. ludoviciana* PCR product with *EcoRI* (down).

پس از هضم آنزیمی با آنزیم Eco47III در هیچیک از بیوتیپ های مورد مطالعه باندهای ۱۴۱bp و ۳۵۱bp مشاهده نشد (شکل ۳) که بیانگر آن بود که در هیچکدام از بیوتیپ های مقاوم یولاف وحشی مورد مطالعه، جهش در نقطه ۲۰۸۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase رخ نداده است. در مطالعاتی که قبلاً توسط زند و همکاران (Zand et al., 2009, 2010b) و بناءکاشانی (Bena Kashani, 2011) صورت گرفته نیز جهش در نقطه ۲۰۸۸ گزارش نشده است.

جایگزینی C با T در کدون ۲۰۸۸ در ژن کدکننده ACCase پلاستیسی باعث تغییر آمینو اسید Cys به Arg و ایجاد محل برشی آنزیم Eco47III می شود (جدول ۴). بنابراین از جفت پرایمرهای مشابه قبل یعنی ACCF1/ACCR1 (جدول ۳) برای تکثیر قطعه ۴۹۲bp استفاده شد. پس از هضم با آنزیم Eco47III در شرایط یاد شده، انتظار می رود که گیاهان حساس هموزیگوت (Cys/Cys) باند هضم نشده ۴۹۲bp، گیاهان هموزیگوت مقاوم (Arg/Arg) دو باند ۱۴۱bp و ۳۵۱bp و گیاهان هتروزیگوت (Cys/Arg) نیز هر سه فوق را نشان دهند (Yu et al., 2007).



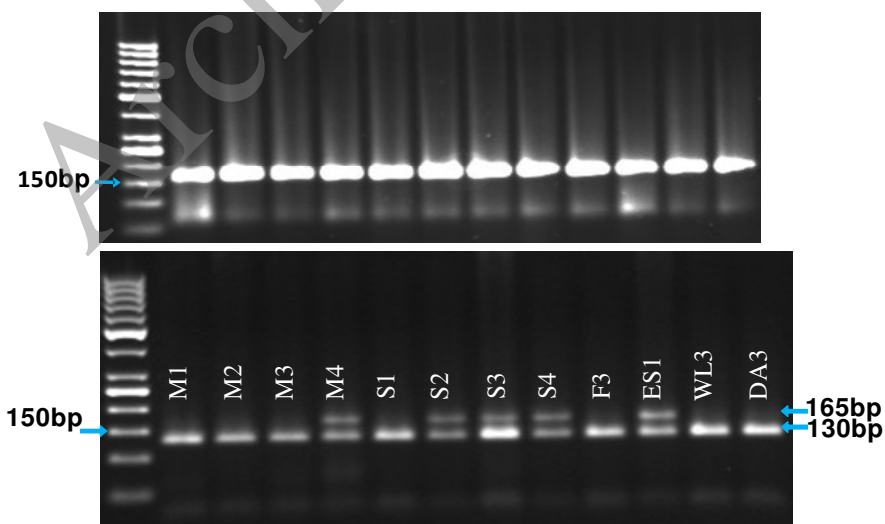
شکل ۲- نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی Eco47III

Figure 2- Results of enzyme digestion of *A. ludoviciana* PCR product with Eco47III.

را نشان دهند (Kaundun & Windass, 2006). واکنش PCR با موفقیت انجام و باند مورد نظر ۱۶۵ جفت بازی در همه توده‌ها تکثیر شد. از میان ۱۲ بیوتیپ مورد مطالعه، ۵ بیوتیپ M4، S2، S3، S4 و ES1 بعد از برش آنزیمی دو باند ۱۶۵bp و ۱۳۰bp را نشان دادند (شکل ۵) که این موضوع دلیلی بر مقاوم و هتروزیگوت (Ile/Leu) بودن آنها بود. بقیه بیوتیپ‌ها باند برش خورده ۱۳۰ جفت بازی را نشان دادند، بیانگر اینکه این بیوتیپ‌ها در جایگاه ۱۷۸۱ ژن کدکننده آنزیم ACCase دچار جهش نشده‌اند.

نتایج مربوط به روش dCAPS

جایگزینی نوکلوتیدهای C و T بجای A در کدون ۱۷۸۱ در ژن کدکننده ACCase پلاستیسی باعث تغییر آمینو اسید Ile به Leu می‌شود. جهت تشخیص گیاهان مقاوم از جفت پرایمرهای NsiI1781f / NsiI1781r (جدول ۳) برای تکثیر قطعه ۱۶۵bp استفاده شد و انتظار می‌رود که پس از هضم با آنزیم *Zsp2I* (*AvaIII*) در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ساعت، گیاهان حساس هموزیگوت (Ile/Ile) باند ۱۳۰bp، گیاهان مقاوم هموزیگوت (Leu/Leu) باند هضم نشده ۱۶۵bp و گیاهان هتروزیگوت (Ile/Leu) نیز هر دو باند فوق



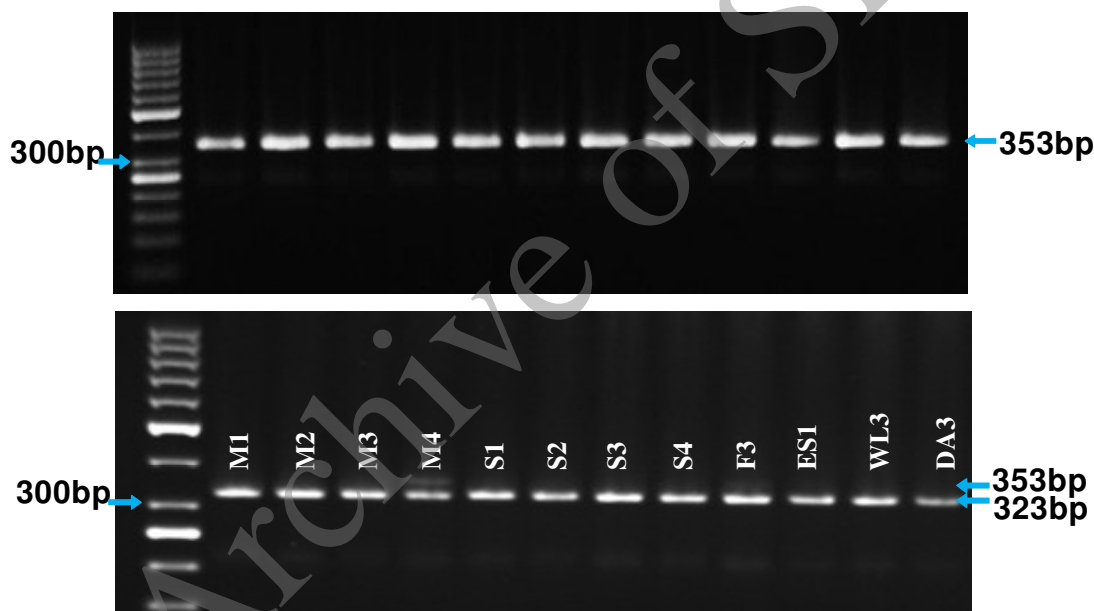
شکل ۳- نتیجه آزمایش PCR و تشکیل باند ۱۶۵bp (شکل بالا) و نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR بیوتیپ‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی *Zsp2I* (*AvaIII*) (شکل پایین).

Figure 3- Results of PCR (up) and enzyme digestion of *A. ludoviciana* PCR product with *Zsp2I* (*AvaIII*) (down).

نشان داد که نشان‌دهنده مقاوم و هتروزیگوت (Asp/Gly) بودن این بیوتیپ است (شکل ۴). بقیه توده‌ها باند برش خورده ۳۲۳bp را نشان دادند به این معنا که جهشی در نقطه ۲۰۷۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase این بیوتیپ‌ها بروز نکرده است.

(Gherekhloo, 2008) دلیل مقاومت برخی از توده‌های فالاریس (*P. minor*) را به طیفی از علف‌کش‌های APP در نتیجه بروز جهش در جایگاه ۲۰۷۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase دانسته است.

در تعیین موتاسیون Asp به Gly در کدون ۲۰۷۸ از جفت پرایمرهای ACCF1/EcoRV2078r (جدول ۳) جهت تکثیر قطعه ۳۵۳ جفت بازی استفاده شد و انتظار می‌رود که پس از هضم با آنزیم EcoRV (جدول ۳) در شرایط یاد شده، گیاهان حساس هموزیگوت (Asp/Asp) باند برش خورده ۳۲۳bp، گیاهان مقاوم هموزیگوت (Gly/Gly) باند هضم نشده ۳۵۳bp و گیاهان هتروزیگوت (Asp/Gly) نیز ترکیبی از دو باند فوق را باید نشان دهند (Yu et al., 2007). از میان بیوتیپ‌های مورد مطالعه بیوتیپ M4 دو باند ۳۵۳ و ۳۲۳ جفت بازی را



شکل ۴- نتیجه آزمایش PCR و تشکیل باند 300 bp (شکل بالا) و هضم آنزیمی محصول PCR توده‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی EcoRV (شکل پایین).

Figure 4- Results of PCR (up) and enzyme digestion of *A. ludoviciana* PCR product with *Zsp21* (*AvaIII*) (down).

نتیجه‌گیری

۱۷۸۱، ۲۰۴۱ و ۲۰۷۸ جهش داشتند و فراوانترین جهش در این بیوتیپ‌ها مربوط به نقطه ۱۷۸۱ بود. بررسی‌های انجام شده نشان داده که جهش در ناحیه ۱۷۸۱ از اهمیت و عمومیت بیشتری در بین گونه‌های باریک‌برگ برخوردار است (Delye et al., Delye et al., 2003 & Preston, 2009). ۲۰۰۵ نمونه‌های زیادی از مقاومت ACCase گزارش شده است که به علت جهش‌های محل هدف است (Preston &

بر اساس نتایج بدست آمده از میان ۱۰ بیوتیپ یک بیوتیپ در نقطه ۲۰۴۱ (۱۰٪ بیوتیپ‌ها)، یک بیوتیپ در جایگاه ۲۰۷۸ (۱۰٪ بیوتیپ‌ها) و ۵ بیوتیپ (۵۰٪ بیوتیپ‌ها) در نقطه ۱۷۸۱ ژن کدکننده آنزیم ACCase دچار جهش شده بودند. در مجموع ۷۰٪ بیوتیپ‌های مقاوم حداقل در یکی از نقاط

عرضی درون جمعیت‌های علف‌های هرز مقاوم به بازدارنده‌های ACCase با الگوهای معمول مقاومت متفاوتند (Preston & Mallory-Smith, 2001). زند وهمکاران (Zand *et al.*, 2009, 2010b) رایج ترین جهش در توده های مقاوم یولاف وحشی ایران را جهش در نقطه ۱۷۸۱ گزارش کردند. این الگوهای مختلف مقاومت عرضی نشان دهنده این است که جهش‌های چندگانه درون ACCase باعث مقاومت می‌شوند. بنابراین ممکن است جایگزینی بازهای آلی در سایر جایگاه‌های ژن یاد شده رخ داده که در این آزمایش و با پرایمرهای مورد استفاده قابل شناسایی نبوده‌اند. از طرفی سایر مکانیسم‌های مقاومت مبتنی بر غیر هدف نیز در مورد این بیوتیپ‌ها دور از تصور نمی‌باشد، که لازم است در مطالعات آتی مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش‌های CAPS و dCAPS در عین سادگی و ارزانی نسبی قادر به شناسایی جهش‌های ژنتیکی رخ داده در جایگاه های ۱۷۸۱، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase بیوتیپ‌های یولاف وحشی می‌باشد. با توجه به شباهت بسیار توالی این آنزیم در گونه‌های علف هرز باریک‌برگ رایج در مزارع کشور، احتمال کارایی روش‌های ملکولی یاد شده در بررسی مبنای ملکولی مقاومت در بیوتیپ‌های فالاریس و چچم مقاوم به بازدارنده‌های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز وجود دارد. کاربرد این روش‌ها در شناسایی بیوتیپ‌های مقاوم علف‌های هرز علاوه بر سرعت، باعث پیش آگاهی زارعین شده و آنها را در تصمیم‌گیری‌های مدیریتی یاری می‌کند.

(Mallory-Smith, 2001). جانشین شدن اسید آمینه لوسین بجای ایزولوسین (Ile1781Leu) در موقعیت ۱۷۸۱، یک جهش نقطه ای کلیدی ایجاد کننده مقاومت به اغلب علف‌کش‌های فوپ و دیم در گونه‌های علف هرز باریک برگ می باشد. پرستون (Perston, 2003) نیز این جایگزینی را مهم‌ترین مکانیزم مقاومت مبتنی بر هدف در بیوتیپ‌های مقاوم ذکر و عنوان کرده‌که دلیل مشخصی تاکنون برای این امر تشخیص داده نشده است. بیوتیپ M4 در دو نقطه ۱۷۸۱ و ۲۰۷۸ دچار جهش شده بود. (Bena Kashani 2011) نیز در بررسی ۱۳ بیوتیپ یولاف وحشی (*A. ludoviciana*)، یک جهش نقطه‌ای Ile1781Leu را در هفت بیوتیپ و دو جهش Ile1781Leu و Asp-2078-Gly را در یک بیوتیپ مقاوم به بازدارنده‌های ACCase یولاف وحشی گزارش کرد. این بیوتیپ‌ها بجز دو بیوتیپ که به علف کش ترالکوکسیدیم حساس بودند، به سایر علف‌کش‌های فوپ، دیم و دن مورد بررسی مقاومت نشان دادند. فرخلو (Gherekhloo, 2008)، نیز در مطالعه‌ای گزارش کرد که در یکی از توده‌های مقاوم فالاریس (SR3) در دو نقطه ۲۰۷۸ و ۲۰۲۷ جهش رخ داده و باعث مقاومت این توده به برخی از علف‌کش‌های APP و احتمالاً CHD شده است. با وجودیکه بیوتیپ‌های M3، M1، S1 و F3 درجات مقاومت بالایی به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل، ستوکسیدیم و پینوکسادن نشان داده بودند (جدول ۲) ولی در این آزمایش در هیچ‌یک از نقاط ۱۷۸۱، ۲۰۴۱، ۲۰۷۸ و ۲۰۸۸ ژن کدکننده آنزیم ACCase آنها تغییری مشاهده نشد. البته این بدان معنا نیست که مقاومت در این بیوتیپ‌ها مبتنی بر هدف نمی‌باشد، الگوهای مقاومت

منابع

Bena Kashani, F. 2011. Investigation of the molecular basis and relative fitness of resistant and susceptible wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) biotypes to Acetyl Co-A- carboxylase herbicides. PhD thesis, University of Tehran. 150 pp. (In Persian with English summary).

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

Dastoori, M., Rahimian, H., Zand, E., Alizadeh, H. and Bahrami, S. 2010. Molecular Basis for Resistance of *Lolium rigidum* Populations to Aryloxyphenoxy Propionate Herbicide through

- dCAPS. Iran. J. of Field Crop Sci. 41:677-684. (In Persian with English summery).
- Délye, C., Zhang, X. Q., Chalopin C., Michel, S. and Powles, S. B. 2003. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiol.* 132: 1716-1723.
- Délye, C., Zhang, X. Q., Michel, S., Matejíček, A. and Powles, S. B. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiol.* 137:794-806.
- Délye, C., Matejíček, 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.
- Délye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* 53: 728-746.
- Gherekhloo, J. 2008. Tracing resistant *Phalaris minor* populations and studying their resistance mechanisms to Aryloxyphenoxy propionate herbicides in Fars and Golestan wheat fields. PhD Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English summery).
- Gherekhloo, J. and Zand, E. 2010. A short review on conducted herbicide-resistance researches in Iran. 11th Iranian Crop Science Congress. 24-26 July. Tehran (Keynote). (In Persian with English summery).
- Gherekhloo, J., Rashed Mohassel, M. H., Nasiri Mahalati, M., Zand, E., Ghanbari, A., Osuna, M. D., Ruiz-Santaella, J. P., Wagner, J. and De Prado, R. 2008. ACCase mutations confer ACCase resistance in two *Phalaris minor* populations from Iran. The proceeding of the 5th International Weed Sci. Vancouver, Canada.
- Kaundun, S. S. and Windass, J. D. 2006. Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* 46: 34-39.
- Konieczny, A. and Ausubel, F. M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Liu W. J., Harrison, D. K., Chalupska, D., Gornicki, P., O'Donnell, C. C., Adkins, S. W., Haselkorn, R. and Williams, R. R. 2007. Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. The proceeding of National Academy of Sci., 27 February. 104:3627-3632.
- Mallory-Smith, C. and Namuth, D. 2006. Herbicide resistance: mechanisms, inheritance, and molecular genetics. <http://www.plantandsoil.unl.edu>. Accessed: May 13, 2007.
- Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* 14: 387-392.
- Perston, C. 2003. Inheritance and linkage of metabolism-based herbicide cross-resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51: 4-12.
- Perston, C. 2009. Herbicide resistance: Target site mutation. In: C. Neal Stewart Jr. Weedy and Invasive Plant Genomics. Wiley Blackwell. Pp. 127-148.
- Preston, C. and Mallory-Smith, C. A. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. Pages 23-60 In: Powles, S. B. and Shaner, D.L. eds. Herbicide resistance and world grains. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rastgoo M., 2007. Detecting of *Avena ludoviciana* resistant to aryloxyphenoxypropionate herbicides in wheat fields of Khuzestan province. PhD Thesis. Ferdwosi University of Mashhad. (In Persian with English summery).
- Sasanfar, H. R., Zand, E., Baghestani, M. A. and Mirhadi, M. J. 2009a. Resistance of winter Wild Oat (*Avena ludoviciana*) populations to pinoxaden in fars province. Iran. J. of Weed Sci. 5: 1-13. (In Persian with English summery).
- Sasanfar, H. R., Zand, E., Baghestani, M. A. and Mirhadi, M. J. 2009b. Resitance of wild oat (*Avena ludoviciana*) populations to clodinafop-propargyl herbicide in fars province. *Environmental Sci.* 7: 109-118. (In Persian with English summery).
- Yu Q., Zheng, M., Owen, M., Sattin, M. and Powles, S. B. 2007. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistance *Lolium* population: using clethodim. *Plant Physiol.* 145: 547-558. (In Persian with English summery).
- Zand, E., Razmi, A., Bana Kashani, F., Nazari, F. and Gherekhlo, J. 2009. Using the dCAPS method to detect the resistance of wild oat (*Avena*

ludoviciana Durieu.) to clodinafop-propargyl in comparison with current methods. Iran. J. of Weed Sci. 5: 33-52. (In Persian with English summery).

Zand, E., Baghestani, M. A., Nezamabadi, N. and Shimi, P. 2010a. The most important herbicides and weeds of Iran. Iran University Press. 134 pp. (In Persian with English Summery).

Zand, E., Razmi. A., Bana Kashani, F., Nazari, F. and Rastgo, M. 2010b. Comparison of resistance of grass weeds to clodinafop-propargyl using glass-house and molecular methods. Iran. J. of Weed Sci. 6:11-22. (In Persian with English Summery).

Archive of SID

Using CAPS and dCAPS Methods to Detect some Mutations that Cause Resistance to Acetyl Coenzyme A Carboxylase Inhibiting Herbicides in Wild Oat (*Avena ludoviciana*)

Eskandar Zand¹, Arash Razmi¹, Fatemeh Benakashani², Noushin Nezamabadi¹, Javid Gharakhloo³, and Hamid Reza Sasanfar¹

1- Weed Research Department of Iranian Research Institute of Plant Protection, 2- Institute of biotechnology and bioengineering, Isfahan University of technology, 3- Gorgan University

Abstract

Consecutive usages of acetyl Coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides to control troublesome grass weeds of wheat in Iran, has resulted in resistance of 5 grass weeds to ACCase inhibitors. Recently some resistant *Avena* spp. biotypes have been detected in wheat fields of Iran which have developed resistance to clodinafop propargyl, setoxydim and pinoxaden herbicides with resistance factor between 1.31 to more than 50.63. This experiment was conducted to use CAPS and dCAPS method to detect mutation probably occurred in 1781, 2041, 2078 and 2088 positions of encoding gene of ACCase enzyme and resulted in resistance of resistant wild oat biotypes to ACCase inhibiting herbicides. Results showed that the cause of resistance in 50% of the biotypes (including M4, S2, S3, S4 and ES1) was mutation at the position 1781, 10% (including M2 biotype) at the position 2041 and 10% (including M4) at the position 1781 and 2078. Generally 70% of biotypes showed mutation at least in 1781, 2041 and 2078 positions. The cystein-2088-arginin substitutions were not identified as a mutation endowing resistance in any of the biotypes. In other biotypes (M1, M3, S1 and F3) mutation may have occurred in other positions of gene encoding ACCase, or the resistance in these biotypes is a non-target based mechanism.

Key words: Clodinafop-propargyl, pinoxaden, restriction enzyme, setoxydim.

Archive