نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۲۷۶-۲۷۰

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 10, No. 2, Summer. 2012, p. 270-276

ارزیابی مولکولی مقاومت به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات در توده‌های یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Duriu.) مزارع گندم استان خوزستان

مهدی راستگو[۱*] - محمد حسن راشد محصل[۲]- حمیدرضا کاووسی [۳]- امین میرشمسی کاخکی [٤]- اسکندر زند[٥]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۶/۲۳

چکیده

به‌منظور تایید مقاومت به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات در توده‌های یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Duriu.) مزارع گندم استان خوزستان آزمایشی مولکولی در سال ۱۳۸۵ در دانشکده‌کشاورزی دانشگاه فردوسی انجام شد. ابتدا ۴۴ توده یولاف وحشی جمع‌آوری شده از شهرهای اهواز، اندیمشک، شوش، شوشتر، رامهرمز، سوسنگرد و دزفول به همراه یک تودهٔ حساس، مورد آزمایش‌های غربال قرار گرفتند که از میان آن‌ها ۳۷ توده مشکوک به مقاومت شناخته شدند و جهت آزمایش‌های مولکولی تعیین مکانیزم مقاومت مورد استفاده قرار گرفتند. روش dCAPS طی سه مرحله PCR، هضم آنزیمی و الکتروفورز بر روی ژل انجام شد. نتایج آزمایش نشان داد که جهش در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیم آ در ۱۰ توده یولاف وحشی از شهرهای اندیمشک (۵)، شوش (۱)، شوشتر (۲) و سوسنگرد (۲) سبب مقاومت به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل، دیکلوفوپ متیل و فنوکساپروپ پی‌اتیل شده است. در سایر توده‌های مقاوم، احتمال وجود سایر مکانیزم‌های مقاومت از جمله متابولیسم وجود دارد. همچنین مشخص شد که این روش جهت شناسایی مقاومت به علف‌کش‌ها و نیز تعیین مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌ها در یولاف وحشی زمستانه روش خوبی است.

واژه‌های کلیدی: بازدارنده‌های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز، مقاومت مبتنی بر متابولیسم، مقاومت مبتنی بر محل هدف

مقدمه

علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز[۶] (ACCase) به شکل گسترده‌ای به‌صورت علف‌کش‌های انتخابی پس از سبزشدن برای کنترل علف‌های هرز باریک برگ در محصولات زراعی پهن برگ و نیز باریک برگ مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۸). استفاده مداوم از این نوع علف‌کش‌ها منجر به ظهور بیوتیپ‌های مقاوم به این علف‌کش‌ها شده است (۲ ، ۲۳ ، ۲۴ و ۲۵). بر اساس گزارشات موجود تا کنون ۳۵ گونه علف‌هرز در بیش از۲۴ کشور دنیا نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase مقاوم شده‌اند (۱۶). یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Duriu.) در ۲۲ استان کشور به عنوان مهم‌ترین علف‌هرز باریک برگ مطرح بوده است و سال‌هاست که از علف‌کش‌های خانواده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات از جمله کلودینافوپ پروپارژیل برای کنترل علف‌های هرز باریک برگ مزارع غلات بویژه این‌گونه علف‌هرز استفاده می‌شود(۲). اخیراً در استان خوزستان موارد متعددی از عدم کنترل موفقیت‌آمیز این علف‌هرز در مزارع گندم توسط کشاورزان محلی گزارش شده است. با توجه به سابقه مصرف علف‌کش‌های این خانواده در مزارع غلات این استان، یکی از فرضیاتی که می‌توان برای کنترل نامناسب یولاف وحشی توسط علف‌کش‌های رایج ارایه نمود، مقاوم شدن علف‌هرز یولاف وحشی زمستانه به علف‌کش‌های این خانواده می‌باشد. این مساله توسط بناکاشانی و همکاران (۱) مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که برخی از توده‌های جمع آوری شده دارای مقاومت نسبتا بالایی به علف‌کش‌های خانواده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات می‌باشند. پی‌جویی مقاومت به علف‌کش‌ها و تعیین مکانیزم ایجاد کننده آن، یکی از اجزای حیاتی مورد نیاز در مدیریت پایدار علف‌های هرز

۱، ۲ و۴- به ترتیب استادیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات و استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده‌کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: m.rastgoo@um.ac.ir)
۳- گروه زراعت دانشکده‌کشاورزی دانشگاه کرمان
۵-دانشیار بخش تحقیقات علف‌های هرز، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی

6-Acetyl CoA Carboxylase

می‌باشد (۲۰). به‌طورکلی روش مورد استفاده برای پی‌جویی مقاومت به علف‌کش‌ها می بایست سریع، دقیق و ارزان بوده و به راحتی قابل اجرا باشد (۲۰، ۲۶). در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی به این دلیل که پایش مقاومت را ساده نموده اند و نیز اطلاعاتی را در خصوص مکانیزم مقاومت در اختیار می‌گذارند، رو به پیشرفت می‌باشند (۴، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). در حقیقت استفاده از این روش‌ها به‌عنوان جانشینی برای روش‌های پیچیده و پر هزینه سنجش آنزیمی به‌حساب می‌آید (۶).

جانشینی لوسین بجای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ در دامنه اتصال‌دهنده کربوکسیل ترانسفراز[1] (CT) استیل کوآنزیم آ پلاستیدی در دم روباهی کشیده (*Alopecurus myosuroides*) یک جهش نقطه‌ای کلیدی ایجاد کننده مقاومت به اغلب علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز در گونه‌های علف‌هرز چچم (*Lolium* .spp)، یولاف وحشی (*Avena fatua*) و دم روباهی سبز (*Setaria viridis*) می باشد (۷). این امر حاصل جهش و تبدیل آدنین (A) به تیمین (T) و سیتوزین (C) در موقعیت ۵۳۴۱ در توالی کدکننده آنزیم استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز در دم روباهی کشیده و در موقعیت مشابه در سایر گونه‌ها می باشد (۴ و ۷). این جهش از طریق ارزیابی تکثیر وابسته به آلل[2] قابل شناسایی می‌باشد که علی‌رغم سادگی و اجرا با یک مرحله PCR و سپس الکترفورز ، قادر به تشخیص گیاهان جهش‌یافته هموزایگوس و هتروزایگوس نمی باشد (۶ و ۱۹). با این حال این روش جهت شناسایی مقاومت مبتنی بر محل هدف در تعدادی از علف‌های هرز نظیر دم روباهی سبز، چچم، یولاف وحشی و دم روباهی کشیده، مورد استفاده قرار گرفته است (۴ ، ۷ و ۱۱).

CAPS[3] یا PCR-RFLP یکی دیگر از مارکرهای مولکولی است که در این رابطه مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سه مرحله شامل PCR ، هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل برای تفکیک باندهای هضم شده و هضم نشده انجام می‌شود (۳). این روش نسبت به ارزیابی تکثیر وابسته به آلل فوایدی دارد از جمله اینکه در این ارزیابی از مارکرهای هم بارز استفاده می‌شود که قادر به تشخیص بین بوته‌های هموزایگوس و هتروزایگوس می‌باشد. از سوی دیگر به‌دلیل اینکه در این روش فقط از دو پرایمر استفاده می شود، بر خلاف تکثیر وابسته به آلل مساله رقابت بین پرایمرها عملا بسیار نادر خواهد بود (۱۹). تنها جزء بسیار ضروری برای روش CAPS در دسترس‌بودن آنزیم برشی[4] است که قادر به تشخیص DNA جهش یافته در گونه مقاوم و گونه وحشی باشد. متاسفانه اشکال A ، T ، یا C در ناحیه ۵۳۴۱ (۱۷۸۱) ژن آنزیم استیل کوآنزیم آ قادر به تشخیص با هیچکدام از آنزیم‌های شناخته شده نمی‌باشد، بر این اساس روش dCAPS توسط نف و همکاران (۲۲) به‌عنوان روش جایگزین برای روش CAPs ارایه شد. dCAPs[5] یک رهیافت ساده اقتصادی و قابل قابل تعمیم بین گونه‌های مختلف بوده و به سادگی قادر به تشخیص گونه‌های مقاوم هموزایگوس (Leu/Leu 1781) و هتروزایگوس (Ileu/Leu 1781) می‌باشد که مبنایی برای اندازه‌گیری صحیح فراوانی آلل غالب در یک جمعیت است (۱۹).

روش dCAPs بسیار شبیه CAPs می‌باشد با این تفاوت که با یک یا چند تغییر پایه‌ای در یکی از دو پرایمر مورد نیاز برای PCR در روش CAPS امکان تشخیص ناحیه هضم‌شده برای توالی DNA جهش‌یافته و وحشی میسر شده است. چنین پرایمرهایی به‌طور دستی نیز قابل طراحی می‌باشند ولی استفاده از نرم‌افزار dCAPS Finder که توسط نف و همکاران (۲۱) ارایه شد این امر را ساده‌تر کرد. با استفاده از این نرم‌افزار و بر اساس توالی DNA جهش‌یافته و وحشی لیستی از جهش‌های نقطه‌ای ممکن جهت طراحی پرایمر پیش رونده و معکوس و نیز آنزیم برشی در ناحیه مورد نظر حاصل می‌شود. از جمله کاندان و ویندس (۱۹) با استفاده از این نرم‌افزار توالی‌های DNA جهش یافته A5341 و T5341 جهش یافته ژن استیل کوآنزیم آ را در اختیار نرم‌افزار قرار دادند و با فرض یک جهش نقطه‌ای ۴ گروه نتیجه حاصل شد که همگی قادر به شناسایی جهش نقطه‌ای بودند و آن‌ها یک گروه را به‌طور تصادفی مورد استفاده قرار دادند. این محققین از ۴ آنزیم برشی *Nsi* I ، *Fok* I ، *Nla* III ، *Nsp* I و *StySQ* I برای تفکیک توده‌های حساس و مقاوم جمعیت‌های علف‌های هرز دم روباهی سبز، چچم، یولاف وحشی و دم روباهی کشیده استفاده نمودند که بر اساس نتایج حاصله فقط آنزیم *Nsi* I به این دلیل که بر خلاف سایر آنزیم‌ها فقط وابسته به توالی در یک طرف ناحیه جهش یافته می‌باشد، مناسب‌تر شناخته شد. با استفاده از این آنزیم بروز جواب‌های مثبت اشتباه غیر ممکن خواهد بود. در آزمایش کاندان و ویندس (۱۹) درطی PCR یک باند ۱۶۵ bp تولید شد و پس از هضم توسط آنزیم برشی *Nsi* I در توده‌های جهش یافته به‌صورت TT، CCو CT، همان باند ۱۶۵ bp مشاهده شد در حالی‌که در توده وحشی (حساس) یک باند ۱۳۰bp ایجاد شد و توده جهش یافته هتروزایگوس (AT و AC) نیز هر دو باند (۱۳۰ و ۱۶۵ bp) را ایجاد نمود. این آزمایش همچین نشان داد که در توده‌های یولاف وحشی مقاوم مورد مطالعه جهش ۱۰۰ درصد به‌صورت هتروزایگوس می‌باشد (۱۹).

1-Carboxyl Transferase
2-Allele-specific Amplification.
3-Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)
4-Restriction Enzyme
5-Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (dCAPS)

هدف از اجرای این آزمایش تعیین مقاومت و مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات در توده‌های یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Duriu.) مزارع گندم استان خوزستان به روش dCAPs ارایه شده توسط کاندان و وینداس (۱۹) می‌باشد. بر این اساس توده‌هایی که مقاومت در آن‌ها به‌دلیل جهش در محل هدف (آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز) می‌باشد، شناسایی می‌شوند.

مواد و روش‌ها

در بهار سال ۱۳۸۵ بوته‌های یولاف وحشی مشکوک به مقاومت به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات، از مزارع گندم ۷ شهر استان خوزستان شامل اهواز (VR) (۷ توده) ،اندیمشک (NR)(۱۴ توده)، شوش (SOR)(۸ توده)، شوشتر(STR)(۲ توده)، رامهرمز (ZR) (۵ توده) ، سوسنگرد (AR) (۱ توده) ، دزفول (DR) (۸ توده) و نیز یک توده به‌عنوان توده حساس (S) از مناطقی که سابقه هیچ‌گونه مدیریتی و خصوصا مدیریت شیمیایی نداشتند، از جمله حاشیه باغات، توسط آزمایشگاه مقاومت بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، جمع‌آوری و به دانشکده‌کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند. پس از جداسازی بذور و کدبندی آن‌ها، توده‌های مختلف طی سه آزمایش گلخانه ای جداگانه در معرض آزمون غربال توسط دزهای توصیه شده هر علف‌کش (به میزان ۶۴، ۹۰۰، و ۷۵ گرم ماده موثره در هکتار به‌ترتیب برای علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل (تاپیک)، دیکلوفوپ متیل (ایلوکسان)، و فنوکساپروپ پی اتیل (پوماسوپر) قرار گرفتند. در آزمون غربال توده‌هایی که حداقل ۵۰ درصد وزن خشک و ۸۰ درصد تعداد خود را نسبت به تیمار عدم پاشش علف‌کش حفظ نمودند، به‌عنوان مشکوک به مقاومت شناخته شدند و جهت آزمایش‌های تعیین مقاومت به‌همراه توده حساس مورد استفاده قرار گرفتند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بر این اساس از میان ۴۴ توده اولیه تنها ۳۷ توده مشکوک به مقاومت شناخته شدند که به‌همراه توده حساس در آزمایش‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس روش dCAPs ارایه شده توسط کاندان و وینداس (۱۹) این آزمایش در سه بخش شامل استخراج DNA، PCR و هضم آنزیمی به روش زیر انجام شد:

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ابتدا نمونه‌های مربوط به برگ توده‌های یولاف وحشی تهیه شد. برای این منظور ۱۰ بوته از هر توده به تصادف انتخاب شد و از هر بوته نیز ۴ برگ به‌طور تصادفی و از برگ‌های سالم و جوان‌تر انتخاب و از هر برگ قطعه‌ای حدود ۲ سانتی‌متر توسط قیچی استریل جدا شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از قرارگیری در پاکت‌های پلاستیکی بر چسب‌دار در داخل یخ خشک قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. در این آزمایش از روش استخراج CTAB[1](۵ و ۱۳)، جهت استخراج DNA از بافت تازه برگ استفاده شد. پس از استخراج DNA نمونه‌ها به روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز مورد ارزیابی کم و کیفی قرار گرفتند.

واکنش‌های PCR

واکنش‌های PCR طبق دستورالعمل کاندان و وینداس (۱۹) انجام شد. بدین منظور از دو پرایمر جلورونده[2] و معکوس[3] (شرکت Metabion – آلمان) توصیه شده توسط این محققین استفاده شد (جدول ۱). واکنش‌های تکثیری در حجم ۲۵ میکرو لیتر و در دو تکرار همراه با نمونه کنترل منفی انجام گرفت.

واکنش‌ها در دستگاه Biometra برمبنای پارامترهای حرارتی زیر انجام شد:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه – ۳۵ سیکل

۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه

۴ درجه سانتی‌گراد (توقف)

پس از پایان تکثیر، محصولات PCR به نسبت ۵ به۱ از نمونه و بافر راهنمای ×۶ مخلوط شد وسپس روی ژل اگارز ۱/۴ درصد در بافر ۰/۵× TBE تحت ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۱۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز ژل با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس به مدت ۵ دقیقه با استفاده از آب مقطر رنگ بری شد. در انتها تصویر ژل الکتروفورز شده با استفاده از دستگاه Gel Document مشاهده و عکس‌برداری شد.

هضم آنزیمی

پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر (۱۶۵ bp) در مرحله PCR و مشاهده آن بر روی ژل، مرحله بعد یعنی هضم آنزیمی منطبق بر روش کاندان و وینداس (۱۹) انجام شد. بدین منظور از آنزیم برشی[4] I *Mph1103* (III *Ava*) که یکی از ایزوشیزومرهای

1-Cetyl Ttrimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
2-Forward Primer
3-Reverse Primer
4-Restriction Enzyme

آنزیم *Nsi* I (شرکت Fermentas – لیتوانی) می‌باشد، استفاده شد. این آنزیم قادر بـه تشـخیص تـوالی ۳'- ATGCA↓T -۵' مـی‌باشـد. واکنش هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرو لیتر، به‌مدت ۴ سـاعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر اساس مقادیر زیر انجام شد:

PCR product	۱۰ میکرو لیتر
Water, nuclease free	۱۶ میکرو لیتر
10x Buffer R	۲ میکرو لیتر
Enzyme	۱ میکرو لیتر

پس از طی زمان هضم، محصـولات روی ژل اگـارز ۲ درصـد در بافر TBE ۰/۵ × تحـت ولتـاژ ثابـت ۸۰ ولـت بـه مـدت ۹۰ دقیقـه الکتروفورز شد. پس از پایـان الکتروفـورز ژل بـا اسـتفاده از محلـول رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتـر بـه مـدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس به مدت ۵ دقیقـه بـا اسـتفاده از آب مقطـر رنگ‌بری شد و در تصویر ژل الکتروفورز شـده بـا اسـتفاده از دسـتگاه Gel Document مشاهده و عکس‌برداری شد.

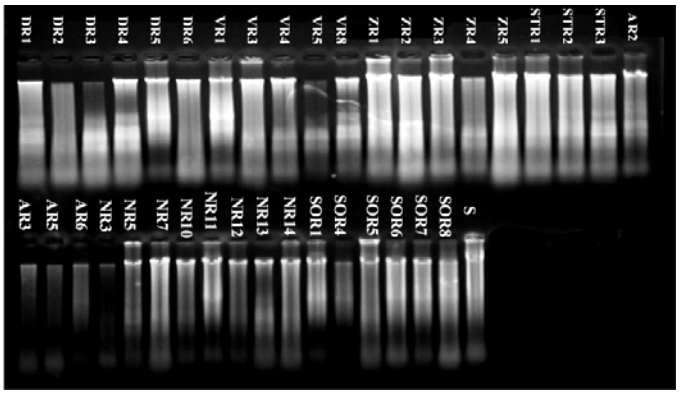
نتایج و بحث

علی‌رغم استخراج DNA در تمـامی تـوده‌هـای یـولاف وحشـی زمستانه، DNA استخراج شده در برخی تـوده‌هـا از کیفیـت مطلـوب برخوردار نبود (شکل ۱).

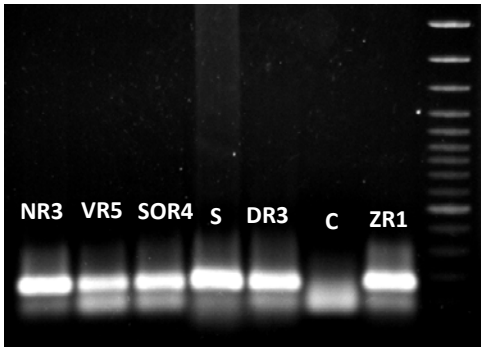
بنابراین قبل از اجرای مرحلهٔ بعد آزمایش یعنی PCR ،تعـدادی از توده‌ها با کیفیت‌های مختلف DNA استخراج شده به‌طور تصادفی در معرض یک آزمایش اولیه PCR با حضور یک نمونه کنترل منفی قرار گرفتند تـا از تـوان تولیـد بانـد مـورد نظـر (pb۱۶۵) توسـط DNA استخراج شده اطمینان حاصل شود (شکل ۲).

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

نوع پرایمر	توالی (۳' – ۵')
جلو رونده	CTGAATGAAGAAGACTATGGTCG
معکوس	AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGCA



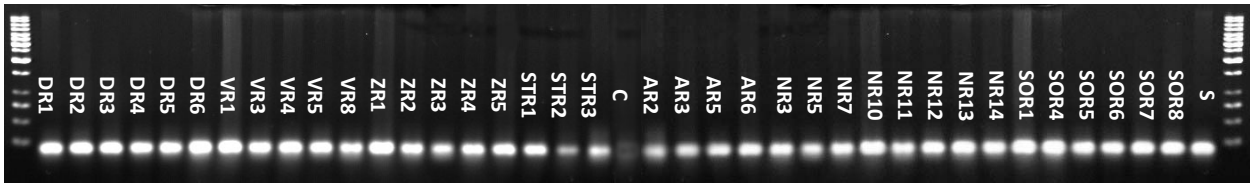
شکل ۱ - ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از توده‌های مختلف یولاف وحشی روی ژل آگارز



شکل ۲- آزمون اولیه بررسی امکان تکثیر باند مورد نظر (bp۱۶۵) بر روی تعدادی از نمونه‌ها با کیفیت‌های مختلف DNA

همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود به‌دلیل اختصاصی بودن پرایمرهای موجود در آزمایش، فرآیند PCR با موفقیت انجام شد و در همهٔ نمونه‌ها باند مورد نظر مشاهده شد. اجرای آزمایش PCR برای همهٔ توده‌ها صحت این موضوع را تأئید نمود و در تمامی توده‌های قرار گرفته در معرض PCR ، باند مورد نظر ایجاد شد که نشان‌دهنده تکثیر توالی مورد نظر بود (شکل ۳).

محصول PCR تمامی توده‌ها در معرض آنزیم برشی، مورد هضم قرار گرفت که حاصل آن تولید باند ۱۳۰bp بود (شکل ۴). از این میان محصول PCR ۱۰ توده یولاف وحشی شامل توده‌های STR1، STR3، AR3، AR6، NR3، NR10، NR11، NR13، NR14 و SOR8 در معرض آنزیم برشی هر دو باند ۱۶۵ و ۱۳۰ bp را ایجاد نمود که نشان از وجود مقاومت مبتنی بر آنزیم هدف به‌صورت هتروزایگوس می‌باشد (AC یا AT). این در حالی است که هضم آنزیمی در ۲۷ توده دیگر مشابه توده حساس منجر به تولید یک باند ۱۳۰ bp شد که نشان از وجود فرم هموزایگوس آلل گونه وحشی (حساس) یولاف وحشی یعنی AA می‌باشد.



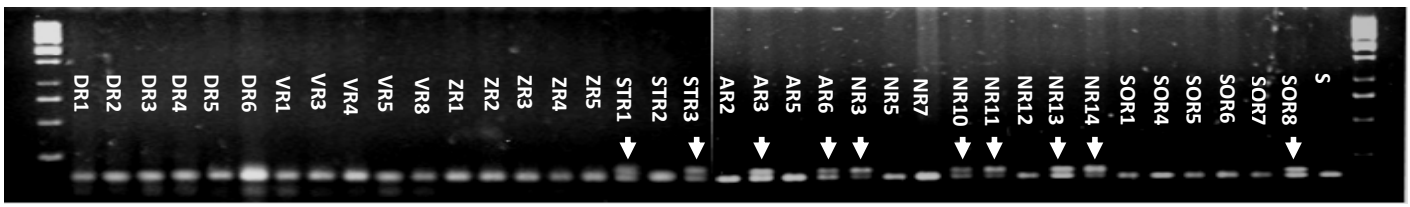
شکل ۳ - نتیجه آزمایش PCR در توده‌های یولاف وحشی و تشکیل باند ۱۶۵ bp در تمامی توده‌ها

در مورد سایر توده‌ها این امکان وجود دارد که مکانیزم مقاومت در این توده‌ها مبتنی بر جهش در آنزیم هدف نبوده و احتمالا سایر مکانیزم‌ها از قبیل مکانیزم مبتنی بر متابولیسم در ایجاد مقاومت این توده‌ها به علف‌کش‌های فوپ نقش دارد.

دلیه و همکاران (۷، ۹ و ۱۰) نشان دادند که جهش در نواحی ۱۷۸۱ و ۲۰۷۸ در دم روباهی کشیده سبب مقاومت به فوپ‌ها و دیم‌ها می‌شود در حالی‌که جهش در موقعیت‌های ۲۰۲۷، ۲۰۴۱ و ۲۰۹۶ فقط مقاومت به فوپ‌ها را به‌دنبال دارد. زاگنیتو و همکاران (۲۷) نیز با مطالعه ذرت و چچم مقاوم به بازدارنده‌های استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز نشان دادند که تبدیل ایزولوسین به لوسین (جهش در ناحیه ۱۷۸۱) در این گیاهان سبب بروز مقاومت شده است. تحقیقات دلیه و میشل (۸) نشان داد که حتی درگونه‌های با تحمل ذاتی نظیر گونه چپر (*Poa annua*) نیز وجود کدن لوسین ۱۷۸۱ سبب این توانایی در گیاه شده است.

در عمده تحقیقات از روش تکثیر وابسته به آلل جهت شناسایی این جهش استفاده شده است (۴، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲). از جمله دلیه و همکاران (۷ و ۱۱) روش تکثیر وابسته به آلل را جهت شناسایی جهش نقطه‌ای در موقعیت ۱۷۸۱ در دم روباهی کشیده، دم روباهی سبز، و چچم مورد استفاده قرار دادند و نتایج قابل قبولی از کاربرد این روش به‌دست آوردند.

کریستوفر و همکاران (۴) نیز با استفاده از این روش به مطالعه جهش در بیوتیپ مقاوم یولاف وحشی (UM33) پرداختند. نتایج آنها نیز نشان داد که قرارگیری لوسین به‌جای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ سبب بروز مقاومت در این گیاه شده است. آن‌ها همچنین مشاهده کردند که در توده‌های حساس، ایزولوسین در آنزیم پلاستیدی وجود دارد، ولی در توده مقاوم، لوسین هم در فرم پلاستیدی و هم فرم سیتوسولی مشاهده شد.



شکل٤ - نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR توده‌های یولاف وحشی با استفاده از آنزیم برشی

علی‌رغم گستردگی استفاده از این روش جهت شناسایی جهش نقطه‌ای یاد شده، کاندان و ویندس (۱۹) با الهام گرفتن از روش‌های CAPS و dCAPS و با اعمال تغییراتی در این روش‌ها، روش dCAPS را جهت شناسایی جهش نقطه‌ای در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیم آ معرفی کردند. آن‌ها نشان دادند که کارایی این روش در مقایسه با روش تکثیر وابسته به آلل بیشتر است، چرا که این روش قادر به تشخیص فرم‌های هموزایگوس و هتروزایگوس بوده و براحتی قابل تعمیم به همه علف‌های هرز باریک برگ می‌باشد (۱۹). نتایج آزمایش نشان داد که جهش در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیم آ در ۱۰ توده یولاف وحشی از شهرهای اندیمشک (۵)، شوش (۱)، شوشتر (۲) و سوسنگرد (۲) سبب مقاومت به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل، دیکلوفوپ متیل و فنوکساپروپ پی‌اتیل شده است. در سایر توده‌های مقاوم، احتمال وجود سایر مکانیزم‌های مقاومت از جمله متابولیسم وجود دارد. همچنین مشخص شد که استفاده از این روش به‌منظور شناسایی مقاومت و نیز تعیین مکانیزم ایجاد کننده مقاومت در یولاف وحشی زمستانه بسیار کارآمد بوده و در حداقل زمان ممکن می‌توان تعداد بسیار زیادی نمونه را مورد ارزیابی قرار داد.

منابع

۱- بناکاشانی، ف.، ا. زند، و ح. محمد علیزاده. ۱۳۸۵. مقاومت بیوتیپ‌های علف‌هرز یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) به علف‌کش کلودینافوپ- پروپارژیل. مجله آفات و بیماری‌های گیاهی.

۲- منتظری ، م.، ا.، زند، و م. ع. باغستانی . ۱۳۸۴. علف‌های و کنترل آن‌ها در کشتزارهای گندم ایران. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.

3- Barth, S., A. E., Melchinger, and T. Luebberestedt. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology, 11: 495- 505.

4- Christoffers M.J., M. L. Berg, and C. G. Messersmith. 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat.Genome, 45: 1049–1056.

5- Cullings, K.W.1992.Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionart studies. Molecular Ecology, 1: 233-240.

6- De´lye C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. Weed Science, 53: 728-746.

7- De´lye C., A. Mate´jicek, and J. Gasquez. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.). Pest management Science 58:474-478.

8- De´lye C., and S. Michel. 2005. 'Universal' primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acethyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. Weed Research, 45: 323-330.

9- De´lye C., C. Straub, S. Michel, and V. L. Corre. 2004. Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). Molecular Biology and Evolutionary, 21:884-892.

10- De´lye C., E. Calmes, and A. Mate´jicek.2002. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) genotypes resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. Theory and Applied Genetic, 104: 1114 – 1120.

11- De´lye C., T. Wang, and H. Darmency. 2002. An isoleucine – leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis*) is responsible for resistance to cyclohexanedione herbicide sethoxydim. Planta, 214: 421-427.

12- De´lye C., X. Q. Zhang, S. Michel, A. Mate´jicek, and S. B. Powles. 2005. Molecular bases for sensivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. Plant Physiology, 137:794-806.

13- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.

14- Friesen, L. F., T. L. Jones, R. C. Van Aker, and I. N. Morrison. 2000. Identification of *Avena fatua* populations resistant to imazamethabenz, flamprop, and fenoxaprop-P. Weed Science, 48:532-540.

15- Hall, L. M., J. Beckie, and T. M. Wolf. 1999. How herbicides work? Biology to application. Alberta Agriculture Food and Rural development.

16- Heap, I. 2009. International survey of herbicide resistance weeds. Online Internet. 2 January 2009. www.weedscience.org.

17- Heap, I., and I. N. Morrison. 1996. Resistance to Aryloxyphenoxy-propionate and Cyclohexanedione herbicides in green foxtail (*Setaria viridis*). Weed Science, 44:25-30.

18- Incledon, B. J., and J. C. Hall. 1997. Acetyl-Coenzyme A Carboxylase: Quaternary Structure and Inhibition by Graminicidal Herbicides. Pesticide Biochemistry and Physiology, 57: 255–271.
19- Kaundun, S. S., and J. D. Windass. 2006. Derived cleaved amplified polymorphic, a simple method to detect a key point mutation conferring acethyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. Weed Research, 46:34-39.
20- Moss, S. R. 1995. Techniques for determining herbicide resistance. Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 547-556.
21- Neff, M. M., E. Turk, and M. Kalishman. 2002. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. Trends in Genetics, 18: 613 – 615.
22- Neff, M. M., J. D. Neff, J. Chory, and A. E. Pepper.1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. Plant Journal, 14:387-392.
23- Powles, S. B., C. Peterson, I. B. Bryan, and A. R. Jutsum. 1997. Herbicide resistance: Impact and management. Advance in Agronomy, 58:57-93.
24- Prado, R. D., J. Jorrin, and L. G. Torres. 1977. Weed and Crop Resistance to Herbicides. Kluwer Academic Publishers.
25- Rashid, A., C. I. Johnson, A. Aziz Khan, and J. T. O'Donovan. 1997. Effects of Triallate and Difenzoquat on Fatty Acid Composition in Young Shoots of Susceptible and Resistant *Avena fatua* Populations. Pesticide Biochemistry and Physiology, 57: 79–85.
26- Tal, A., E. Kotoula-Syka, B. Rubin. 2000. Seed-bioassay to detect grass weeds resistant to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. Crop Protection, 19: 467-472.
27- Zagnitko, O., J. Jelenska, G. Tevzadze, R. Haselkorn, and P. Gornicki. 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acethyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. Proceeding of the Nationa Academy of Sciences of the USA, 98: 6617-6622.