مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۶۸۴-۶۷۷)

ردیابی مولکولی مقاومت توده‌های چچم (*Lolium rigidum*) استان فارس به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات به روش dCAPS

مونا دستوری[۱]*، حمید رحیمیان[۲]، اسکندر زند[۳]، حسن علیزاده[۴]، محمود معصومی[۵] و سارا بهرامی[۶]
۱، ۲، ۴، ۶، دانشجوی سابق دکتری، استاد، دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، دانشیار مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور
۵، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
(تاریخ دریا فت: ۸۸/۷/۲۶ – تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۹)

چکیده

به منظور ارزیابی مبنای مولکولی مقاومت توده‌های مختلف چچم *Lolium rigidum* استان فارس به علف‌کش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات، آزمایشی به روش dCAPS در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، انجام شد. ۱۸ جمعیت چچم مشکوک به مقاومت از زرقان، فسا، نورآباد و فیروزآباد که با دوزهای پیشنهادی علف‌کش زنده‌مانی نشان دادند، وارد آزمایش‌های مولکولی مقاومت شدند. آزمایش dCAPS در سه مرحله شامل استخراج DNA، واکنش‌های PCR و هضم آنزیمی برای تعیین مبنای مولکولی مقاومت به علف‌کش انجام شد. نتایج نشان داد که از ۱۸ توده چچم مورد بررسی، ۱۱ توده مقاوم هموزیگوس، ۳ توده مقاوم هتروزیگوس و ۴ توده حساس بودند، که جانشینی اسید آمینه لوسین به جای ایزولوسین در دامنه کدکننده کربوکسیل ترانسفراز استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز و جهش در اسیدآمینه موقعیت ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوانزیم‌آ کربوکسیلاز احتمالاً دلیل مقاومت بالای برخی از توده‌های چچم به علف‌کش‌های مذکور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: PCR، هضم آنزیمی، استخراج DNA، استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز.

مقدمه

به طور کلی در سال‌های اخیر مقاومت به علفکش‌ها به یکی از تحقیقات مهم در دنیا تبدیل شده است (Preston, 2004). استفاده مداوم از علفکش‌ها منجر به ظهور بیوتیپ‌های مقاوم به آنها شده است. اولین مورد مقاومت به علف‌کش‌ها، مدت کوتاهی پس از معرفی آنها و در بیوتیپی از *Lolium rigidum* بود (Powles et al., 1997).

برای مطالعه مقاومت به علفکش‌ها روش‌های گوناگونی وجود دارد که شامل آزمایش‌های زیست سنجی در گلدان، زیست‌سنجی در پتری دیش و آزمایش‌های مولکولی می‌باشد. امروزه استفاده از مطالعات مولکولی، با هدف شناسایی سریع مقاومت و نیز تعیین مکانیزم ایجادکننده مقاومت، از استقبال گسترده‌ای در بین محققین سراسر دنیا روبرو شده است (Fraga & Tasende, 2003).

مطالعات مولکولی با صرف وقت و هزینه کمتر جانشین روش‌های سنجش آنزیمی شده است، و این

* نویسنده مسئول: مونا دستوری تلفن: ۰۹۱۷-۳۲۰۹۲۵۰ E-mail: dastoory_m@yahoo.com

روش در سال‌های اخیر به صورت‌های مختلفی در شناسایی مکانیزم مقاومت به علف‌کش‌های بازدارنده استیل کوآنزیم آ مورد استفاده قرار گرفته است (De´lye & Michel, 2005).

کاربرد سه نشانگر مولکولی، شامل DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی و تفاوت طول قطعات حاصل از هضم DNA[1] (RFLP) و ردیف‌های تکراری ساده[2] (SSR) را برای تحقیقات ژنتیک مقاومت و اکولوژی علف‌های هرز مقاوم به علفکش‌های بازدارنده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (ACCase) به کار برده شد (De´lye et al., 2002). این روش‌ها به طور گسترده در تحقیقات علف‌های هرز به کار می‌رود. انتخاب یک روش بسته به هدف‌های مطالعه، ملاحظات تکنیکی، قابلیت دسترسی آسان به مواد آزمایشگاهی و کاربرد روش دارد.

مطالعات ژنتیکی، به طور چشم‌گیری در تحقیقات علف‌هرز افزایش یافته است. هدف‌های تحقیقات مولکولی علف هرز را می‌توان به چند دسته تقسیم بندی نمود: ارزیابی الگوهای تنوع ژنتیکی علف‌های هرز مهاجم، تشخیص تاکسونومی علف‌های هرز، تعیین محل و منشأ علف‌های هرز و تشخیص مقاومت علف‌های هرز به علفکش‌ها (De´lye et al., 2004).

جانشین شدن آمینو اسید لوسین به جای ایزولوسین در موقعیت 1781 در محل اتصال آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز، جهشی نقطه ای ایجاد می‌کند که باعث مقاومت اکثر گراس‌ها از جمله *Avena fatua*، *Lolium* spp.، *Alopecurus myosuroides.* به علفکش‌های فوپ و دیم می‌شود. علت این امر، تبدیل آدنین (A) به سیتوزین (C) و تیمین (T) در موقعیت 5341 توالی رمزکننده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز در گراس‌ها می‌باشد (De´lye et al., 2002). این جهش با تشخیص تکثیر وابسته به آلل قابل شناسایی می‌باشد، و جهت شناسایی مقاومت مبتنی بر محل هدف در تعدادی از علف‌های هرز باریک برگ از جمله *Lolium rigidum* مورد استفاده قرار گرفته است (Christoffers et al., 2002; De´lye et al., 2002; Zhang & Powles, 2006).

CAPS[3] یا PCR–RFLP یکی از نشانگرهای مولکولی است که برای این منظور استفاده می‌شود. این روش نسبت به ارزیابی تکثیر وابسته به آلل فوایدی دارد، از جمله در این روش از مارکرهای هم بارز استفاده می‌شود که قادر به تشخیص توده‌های هموزیگوس و هتروزیگوس می‌باشد (Kaundun & Windass, 2006; Barth et al., 2002).

در اینجا جزء مهم و ضروری، آنزیم برش‌دهنده است که قادر به تشخیص DNA جهش یافته در گونه مقاوم و حساس می‌باشد. متأسفانه آلل‌های A، C یا T در ناحیه ۵۳۴۱ (۱۷۸۱) ژن آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز، با هیچ‌یک از آنزیم‌های شناخته شده موجود قابل تشخیص نمی‌باشد. بنابراین روشی جایگزین روش CAPS به منظور حل این مشکل ارایه شد. dCAPS یک روش ساده و نسبتاً ارزان است که قادر به تشخیص بین توده‌های مقاوم هتروزیگوس و هموزیگوس می‌باشد، در ضمن برای بیشتر علف‌های هرز باریک برگ می‌تواند به کار برده شود (Neff et al., 1998). تنها تفاوت آن با روش CAPS این است که در یکی از دو پرایمرهای مورد نیاز برای PCR، در روش CAPS یک یاچند تغییر به وجود آمده که در نتیجه آن، امکان تشخیص ناحیه برش خورده برای توالی DNA وحشی و جهش یافته میسر شده است (Barth et al., 2002).

مطالعه‌ای بر روی جانشینی ایزولوسین توسط لوسین درموقعیت ۱۷۸۱ ACCase در دم روباهی، برای نشان دادن جهش کلیدی که باعث مقاومت به علفکش‌های آریلوکسی فنوکسی پروپیونات و سیلکو هگزان دیون در چچم، دم روباهی، یولاف و ارزن شده، انجام شد. این جانشینی از تبدیل آدنین به تیمین یا سیتوزین در موقعیت ۵۳۴۱ در توالی کدکننده ACCase در دم روباهی و موقعیت مشابه در دیگر گونه‌ها ایجاد می‌شود (Kaundun & Windass, 2006). جهش I1781L می‌تواند توسط سنجش‌های پیشرفته تکثیر وابسته به آلل مشخص شود. چنین سنجش‌هایی نمی‌تواند بین هموزیگوس بودن و هتروزیگوس بودن در واکنش تک زنجیره‌ای پلیمراز تمایز قائل شود. یک توالی چند شکلی

1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. Simple Sequence Repeat
3. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

تکثیر یافته مشتق شده (dCAPS) برای توصیف وضعیت I1781L در آنزیم ACCase علف‌های هرز وجود دارد که مزیت‌های این روش (dCAPS)، دسترسی آسان، اقتصادی بودن، و قابلیت بالای انتقال بین گونه‌هاست و می‌تواند مقاومت هموزیگوسی Leu/Leu1781 و هتروزیگوسی Ile/Leu1781 را به طور جداگانه تشخیص دهد و اساسی برای اندازه‌گیری صحیح فراوانی آلل غالب لیوسین در جمعیت گرفته شده فراهم کند.

در این روش از ۵ آنزیم برش‌دهنده (Nsp ،StySQ I ،I Nla III ،Fok I و Nsi) برای توده‌های حساس و مقاوم چند گونه علف هرز از جمله دم روباهی، چچم و یولاف استفاده نمودند که آنزیم Nsi به دلیل این که وابسته به توالی در یک طرف ناحیه جهش یافته می‌باشد، ولی سایر آنزیم‌ها به این شکل نبودند، مناسب‌تر از بقیه تشخیص داده شد. در این روش پس از انجام PCR و الکتروفورز روی ژل، تمامی توده‌ها باند ۱۶۵bp ایجاد می‌کنند ولی پس از هضم توسط آنزیم برش‌دهنده، توده‌های وحشی (حساس) (AA)، باند ۱۳۰bp، توده‌های جهش یافته (مقاوم) هموزیگوس (TT، CC)، باند 165bp و توده‌های جهش یافته (مقاوم) هتروزیگوس (AT، AC) هر دو باند ۱۳۰bp و ۱۶۵bp را تولید می‌کنند (Kaundun & Windass, 2006).

طبق بررسی بر روی پایه مولکولی مقاومت به علف‌کش ستوکسی دیم در دو جمعیت چچم *Lolium multiflora* نشان داده شد که یک جانشینی lle-418-leu در آنزیم ACCase کلروپلاست چچم (شماره AV710293) باعث ایجاد مقاومت به ستوکسی دیم می‌شود (White et al., 2005). هدف از این تحقیق ارزیابی مقاومت توده‌های مختلف چچم به علف‌کش‌های بازدارنده آنزیم ACCase به روش مولکولی dCAPS می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این آزمایش شامل ۷ توده چچم بود که در آزمایش‌های دوز-پاسخ به عنوان توده مقاوم و حساس شناخته شده بودند (Zand et al., 2008). معادلات برازش داده شده در آزمایش مذکور (زیست‌سنجی) با استفاده از معادله سه پارامتری برای تعداد چچم باقی‌مانده نسبت به پیش از سمپاشی و شاخص R/S نشان داد که توده‌های RF2، RF4، RF6 و RF1 به ترتیب مقاوم ترین توده‌ها در این آزمایش بودند و پس از آن به ترتیب توده‌های RF۷، RF۵، RF۳ و در آخر توده S قرار گرفتند. ۱۱ توده بعدی در این آزمایش، شامل توده‌های جمع‌آوری شده مشکوک به مقاومت بود که از مزارع استان فارس که در آنها از علف‌کش‌های باریک برگ کش (گروه بازدارندگان آنزیم استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز) استفاده شده و احتمال بروز مقاومت در آنها تشخیص داده شده بود که همگی این ۱۸ توده، جهت تعیین مکانیزم مقاومت، وارد آزمایش نهایی یعنی تعیین مبنای مولکولی مقاومت شدند. این آزمایش بر اساس روش dCAPS در سه مرحله شامل استخراج DNA، واکنش‌های PCR، و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برش‌دهنده انجام شد (Kaundun & Windass, 2006).

جدول ۱- توده‌های جمع‌آوری شده بر اساس کد، محل و سال جمع‌آوری

کد توده	محل جمع‌آوری	سال جمع‌آوری
FR1، FR2، FR3، FR4، FR5، FR6، FR7، FS15	زرقان	۸۵
FR12،FR13، FR14، FS18	فیروزآباد	۸۶
FR11، FR10،FS16	نیریز	۸۷
FR9،FS17، FR8	فسا	87

استخراج DNA

برای این منظور، برگ‌های جوان و سالم چند بوته از هر توده به طور تصادفی انتخاب شد و بلافاصله درون فویل آلومینیومی قرار گرفت و در نیتروژن مایع منجمد و سپس درون فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. برای این کار ابتدا به روش CTAB بافر تهیه گردید. برای تهیه بافر، مواد و غلظت‌ها عبارت بودند از: CTAB به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، Tris به میزان ۱۰۰میلی‌مولار، EDTA به میزان ۲۰ میلی‌مولار، NaCl به میزان ۱/۴ مولار.

پس از مخلوط کردن مواد پودری بالا، به آن ۲۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه

درون بن‌ماری جوش با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و یا ۲۰ دقیقه درون مگنت قرار داده شد تا کاملاً حل شدن صورت گرفت. سپس طبق روش دویل استخراج صورت گرفت (Doyle & Doyle, 1987).

ابتدا ۰/۲۵ گرم از بافت برگ چچم در داخل هاون چینی ریخته شد و سپس توسط نیتروژن مایع به شکل پودر یکنواختی درآمد. در ضمن همزمان با کوبیدن بافت برگ، به‌منظور جلوگیری از اکسید شدن، آنتی‌اکسیدانتی به نام دی متیل سولفات اضافه شد (یا می‌توان آنتی اکسیدانتی به نام ۲-بتامرکاپتواتانول را که مایع است، به بافر تهیه شده در بالا اضافه نمود) سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از بافر تهیه شده در بالا را به بافت پودر شده اضافه شد و بعد به تیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. در مرحله بعد، تیوب اپندورف به مدت ۲۵-۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در این مدت چندین بار توسط دستگاه ورتکس به هم زده شد. سپس ۸۰۰ میکرو لیتر محلول ۱:۲۴ کلروفرم: ایزوآمین الکل به نمونه اضافه شد و تیوب به خوبی تکان داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، در داخل لوله اپندورف، سه لایه تشکیل شد که لایه بالایی، فاز آبی، لایه میانی مواد زاید و پروتئین‌ها و در قسمت پایین هم کلروفرم قرار داشت. بلافاصله قبل از اختلاط مجدد لایه‌ها، لایه شفاف رویی که همان فاز آبی بود، توسط پیپت برداشته شد و به داخل لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری دیگری منتقل شد طی این عمل حجم محلول برداشته شده نیز تعیین و بلافاصله معادل ۰/۰۸ حجم محلول، استات‌آمونیوم سرد به نمونه اضافه و سپس برابر با حجم آن محلول، به آن ایزوپروپانول الکل سرد اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس نمونه به مدت ۱۵دقیقه در داخل فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از طی زمان یاد شده، نمونه دوباره به مدت ۵ دقیقه و با ۷۰۰۰ دور در دقیقه درون دستگاه قرار گرفته و سانتریفوژ شد. در این مرحله با مشاهده رسوب DNA، محلول رویی با احتیاط خارج شد و بعد به منظور شستشوی رسوب DNA، ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به نمونه اضافه شد. درمرحله بعد، نمونه به مدت ۱ دقیقه با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پس از آن دوباره محلول اضافی خارج شده و همین عمل دوباره با اتانول ۷۰ درصد انجام و باز محلول اضافی با احتیاط خارج شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون دستگاه خشک‌کننده الکل قرار گرفت تا باقیمانده الکل خشک شود. پس از خشک شدن کامل رسوب، در مرحله آخر، ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه شده تا کاملاً حل شد، سپس درون فریزر ۲۰- قرار گرفت. ارزیابی کمی و کیفی DNAهای استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و از نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نیز برای تعیین خلوص نمونه‌های DNA استفاده شد، که مقدار آن بزرگتر یا مساوی ۱/۸ دلیل بر وجود ناخالصی کمتر و کیفیت بهتر می‌باشد. در ضمن به منظور اطمینان بیشتر از کیفیت نمونه‌های DNA از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE استفاده شد که تشکیل باند بر روی ژل دلیل بر وجود DNA بود.

واکنش‌های PCR

این واکنش‌ها طبق دستورکار ارایه شده به وسیله Kaundun & Windass (2006) انجام گرفت. دو آغازگر پیشرو و پسرو توصیه شده به وسیله این محققین عبارت بودند از: آغازگر پیشرو با توالی

$^{5'}$CTGAATGAAGAAGACTATGGTC$^{3'}$

و آغازگر پسرو با توالی

$^{5'}$AGAATACGCACTGGCAATAGCAGCACTT CCATGCA$^{3'}$

درصد CG آغازگر پیش رو برابر ۰/۴ و دمای ذوب آغازگر برابر با ۶۲ درجه سانتی‌گراد و درصد CG آغازگر پس رو برابر ۰/۴۸ و دمای ذوب آغازگر برابر با ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد.

مواد به کار رفته در واکنش PCR و غلظت‌های مربوطه عبارت بودند از: Template DNA (۵۰ نانوگرم بر میکرو لیتر)، PCR Buffer (میزان ۱X)، $Mgcl_2$ پنجاه میلی‌مولار (۲ میلی‌مولار)، dNTP ده میلی‌مولار (۰/۲ میلی‌مولار)، Taq Polymerase (۰/۰۵ واحد در میکرولیتر)، PrimerF و PrimerR (هرکدام۱۰ پیکومول) و هم‌چنین H_2O به مقدار ۱۶/۷۵ میکرولیتر.

واکنش‌های مورد نظر در دستگاه PCR به صورت واکنش‌های حرارتی در دماها و مدت زمان‌های به شرح

زیر انجام شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد توقف.

پس از پایان تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگاروز دو درصد در بافر TBE که درون آن ماده رنگی اتیدیوم بروماید ریخته شده بود با ولتاژ ۷۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید و سپس با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور از ژل عکس‌برداری شد.

هضم آنزیمی

پس از انجام‌شدن آزمایش‌های PCR و تکثیر قطعه موردنظر bp ۱۶۵ و الکتروفورز روی ژل، مرحله سوم آزمایش، یعنی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برش‌دهنده Nsi که قادر به تشخیص توالی ۵-ATGCAT-۳ است، انجام گرفت. این مرحله از آزمایش، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

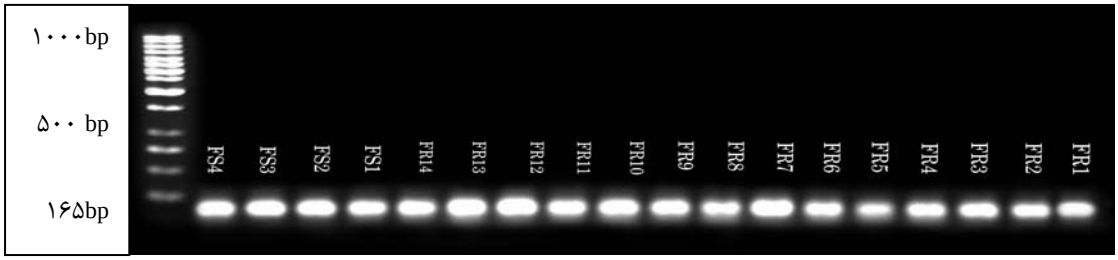
مواد و غلظت‌های به کار رفته در آزمایش هضم آنزیمی عبارت بودند از: PCR product به میزان ۱۰ میکرولیتر، Enzyme به میزان ۰/۵ u، Buffer به میزان ۱X، H_2O به میزان ۸ میکرولیتر.

پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان هضم، محصولات هضم آنزیم روی ژل آگاروز ۲ درصد در بافر TBE که درون آن ماده رنگی اتیدیوم بروماید ریخته شده بود، با ولتاژ ۷۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز و سپس با استفاده از دستگاه ترانس ایلومیناتور از ژل عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از ارزیابی‌های انجام شده در این تحقیق نشانگر آن است که در تمامی توده‌ها، نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ در محدوده استاندارد قرار دارد که این نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA است. برای اطمینان بیشتر از کیفیت DNA، الکتروفورز بر روی ژل که این روش نیز راهی برای ارزیابی کیفیت DNA است، انجام شد. در این روش پس از انجام الکتروفورز، باید باندی ضخیم بر روی ژل مشاهده شود که در اینجا نیز مانند روش پیشین، کیفیت مطلوب DNA مورد تایید قرار گرفت و باندی ضخیم بر روی ژل در تمامی توده‌ها مشاهده شد. نتایج واکنش‌های PCR انجام شده به دلیل اختصاصی بودن پرایمرهای موجود در آزمایش با موفقیت انجام شد و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باند مورد نظر ۱۶۵bp در همه توده‌ها دیده شد که نشان‌دهنده تکثیر توالی مورد نظر بود.

پس از اطمینان از موفقیت واکنش PCR و تولید باند موردنظر، در مرحله بعد، محصولات PCR با استفاده از آنزیم برش‌دهنده Nsi در معرض هضم قرار گرفتند که در اینجا، گونه‌های وحشی (حساس) تولید باند ۱۳۰bp کردند و این نشان از وجود فرم هموزیگوس آلل گونه وحشی (حساس) چچم یعنی AA و گونه‌های جهش یافته (مقاوم)، تولید باند bp ۱۶۵ نمودند که این نیز دلیل بر وجود فرم هموزیگوس آلل گونه جهش یافته (مقاوم) چچم یعنی TT یا CC می‌باشد و گونه‌های مقاومی که هر دو آلل وحشی و جهش یافته را در خود داشتند، (که نشان‌دهنده وجود مقاومت مبتنی بر آنزیم هدف به صورت هتروزیگوس یعنی AC یا AT می‌باشد)، در معرض آنزیم برشی، هر دو باند ۱۳۰bp و ۱۶۵bp را ایجاد نمودند. سایر محققین با مطالعه این روش بر روی تعدادی از باریک برگان از جمله چچم و یولاف، نتایج یکسانی به دست آوردند (Kaundun & Windass, 2006; Rastgou, 2007).



شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR در توده‌های چچم و تشکیل باند 165 bp در تمامی توده‌ها (fermentas)gene rulet ۱۰۰ bp

بر این اساس، توده‌های FR1, FR2, FR4, FR5, FR7, FR8, FR9, FR10, FR12, FR13, FR14 به عنوان توده‌های مقاوم هموزیگوس یعنیTT یاCC و توده‌های FS1, FS2, FS3, FS4 به عنوان توده‌های حساس که همگی هموزیگوس می‌باشند، یعنی AA و توده‌های FR3, FR6, FR11 به عنوان توده‌های مقاوم هتروزیگوس یعنی AC یا AT شناخته شده‌اند.

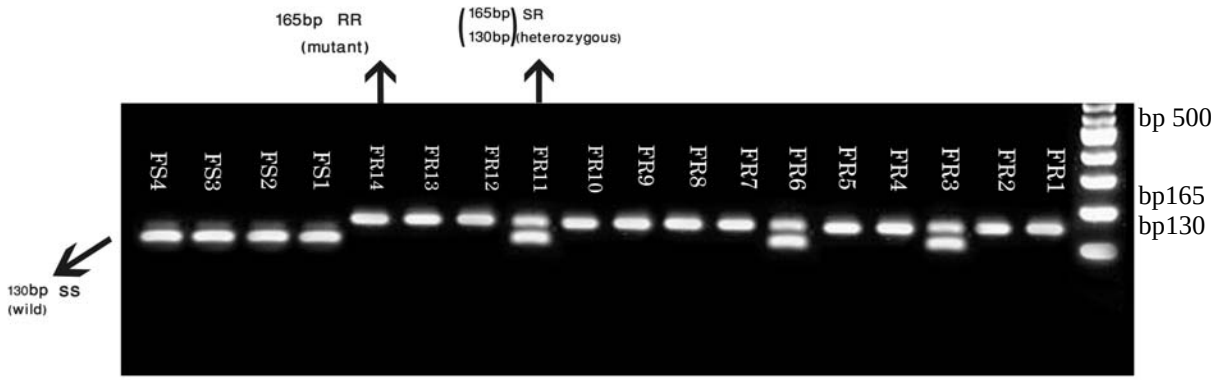
چون در این روش، جهش نقطه‌ای در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیم آ قابل شناسایی می‌باشد، پس به نظر می‌رسد در این توده‌ها، جانشینی لوسین به جای ایزولوسین در ناحیه ۱۷۸۱ اتفاق افتاده باشد (Kaundun & Windass, 2006).

جانشین شدن اسید آمینه لوسین به جای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱ در محل اتصال‌کننده کربوکسیل ترانسفراز (CT) استیل کوآنزیم آ پلاستیدی، یک جهش نقطه‌ای کلیدی ایجادکننده مقاومت به اغلب علف‌کش‌های فوپ و دیم در گونه‌های علف هرز باریک برگ می‌باشد. این امر حاصل جهش و تبدیل آدنین (A) به تیمین (T) و سیتوزین (C) در موقعیت ۵۳۴۱ در توالی کدکننده آنزیم استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز در این گونه‌ها می‌باشد (Christoffers et al., 2002; De´lye et al., 2002a; De´lye et al., 2002b; De´lye et al., 2002c; De´lye et al., 2004; De´ly, 2005; De´lye et al., 2005; De´lye &Micheal, 2005).

همچنین متذکر می‌شود که اختلاف در طول دو آغازگر ارتباطی به سایت برشی ندارد؛ فقط در آغازگر بزرگتر، سایت برشی تعبیه شده است، به طوری که وقتی رونویسی انجام گرفت و توالی قطعه کامل شد، سایت برشی (در اینجا سایت برشی Nsi) در بیوتیپ حساس کامل می‌شود ولی در بیوتیپ مقاوم سایت برشی کامل نمی‌شود و در هضم آنزیمی با آنزیم Nsi، بیوتیپ حساس برش خورده ولی بیوتیپ مقاوم کامل می‌ماند، بنابراین در الکتروفورز، باند مربوط به بیوتیپ مقاوم ۱۶۵ نوکلئوتید و باند مربوط به بیوتیپ حساس ۱۳۵ نوکلئوتید به وجود می‌آورد.

طبق بررسی‌های محققین، جهش در نواحی ۲۰۷۸ و ۱۷۸۱ در دم روباهی کشیده و چچم سبب بروز مقاومت به فوپ‌ها و دیم‌ها می‌شود. در حالی‌که جهش در موقعیت‌های ۲۰۲۷، ۲۰۴۱ و ۲۰۷۸ باعث مقاومت به فوپ‌ها می‌شود (De´lye et al., 2005; De'lye et al., 2002). آنها بیان کردند که حتی در گونه‌های با تحمل ذاتی نظیر گونه *poa. anua* نیز جهش در ناحیه لوسین ۱۷۸۱ سبب بروز مقاومت در این گیاه شده است .در این تحقیق نیز جهش در اسیدآمینه موقعیت ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوانزیم آکربوکسیلاز، احتمال بروز مقاومت به علفکش‌های مذکور می‌باشد.

مطالعه روی ذرت و *L. rigidum* مقاوم به بازدارنده‌های استیل کوآنزیمآ کر بوکسیلاز، نشان داد که تبدیل ایزولوسین به لوسین (جهش در ناحیه۱۷۸۱) در این گیاهان، دلیل ایجاد مقاومت است. در بیشتر تحقیقات از روش تکثیر وابسته به آلل، جهت شناسایی این جهش استفاده شده است (Zagnitko et al., 2001). همچنین محققین، روش تکثیر وابسته به آلل را جهت شناسایی جهش نقطه‌ای در موقعیت ۱۷۸۱ در



شکل ۲- نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR توده‌های چچم با استفاده از آنزیم برش‌دهنده (fermentas) bpgene rulet ۱۰۰

دم‌روباهی کشیده *Alopecurus myosuroides* و چچم *L. rigidum* مورد استفاده قرار دادند (De´lye et al., 2005). مطالعات دیگر با استفاده از این روش نشان داد که قرارگیری لوسین به جای ایزولوسین در موقعیت ۱۷۸۱، سبب بروز مقاومت در یولاف وحشی می‌شود. همچنین مشاهده کردند که در توده‌های حساس، ایزولوسین در آنزیم پلاستیدی وجود دارد، ولیDدر توده مقاوم، لوسین هم درفرم پلاستیدی و هم در فرم سیتوسولی مشاهده شد (Christoffers et al., 2002).

محققین دیگر روش تکثیر وابسته به آلل را در *L. rigidum* جهت شناسایی جهش جانشینی لوسین به جای ایزولوسین به عنوان روشی مناسب برای تشخیص مقاومت مبتنی بر هدف معرفی کردند (Zhang & Powles, 2006).

به رغم گستردگی استفاده از این روش جهت شناسایی جهش نقطه ای یاد شده، با اعمال تغییراتی در روش CAPS، روش dCAPS، جهت شناسایی جهش نقطه‌ای در ناحیه ۱۷۸۱ آنزیم استیل کوآنزیمآ معرفی شد، همچنین مشخص شد، کارایی این روش در مقایسه با روش تکثیر وابسته به آلل بیشتر است؛ چون اولاً این روش قادر به تشخیص فرم‌های هموزایگوس و هتروزایگوس بوده ثانیاً قابل تعمیم به اکثر علف‌های هرز باریک برگ از جمله چچم می‌باشد، پس می‌توان این روش را به منظور تشخیص مقاومت و مکانیزم ایجادکننده آن در اکثر علف‌های هرز باریک برگ در کمترین زمان ممکن و برای نمونه‌های زیاد به کار برد (Kaundun & Windass, 2006).

نتیجه گیری کلی

توده‌هایی که عامل بروز مقاومت در آنها جهش آنزیم هدف تشخیص داده شد (توده‌های مقاوم هموزیگوس)، همان توده‌هایی بودند که بر اساس آزمایش‌های زیست‌سنجی (Zand et al., 2008) نیز از مقاومت بالایی برخوردار بودند و در تمامی آنها مقاومت عرضی به دو یا سه علف‌کش از علف‌کش‌های موجود در آزمایش مشاهده شده بود. در توده‌ای که در آزمایش‌های زیست سنجی در پتری و گلدان مقاوم تشخیص داده شدند (Zand et al., 2008)، ولی در این آزمایش (مولکولی) به عنوان توده حساس معرفی شد، این امکان وجود دارد که مکانیزم مقاومت در این توده‌ها مبتنی بر سایر مکانیزم‌ها از قبیل مکانیزم مبتنی بر متابولیسم باشد. لذا، این آزمایش می‌تواند علاوه بر تشخیص بروز مقاومت، مکانیزم مقاومت را در توده‌ها تعیین نماید.

REFERENCES

1. De´lye, C. (2005). Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science*, 53, 728-746.
2. Powles, S. B., Peterson, C., Bryan, I. B. & Jutsum, A. R. (1997). Herbicide resistance: Impact and management. *Advance Agronomy*, 58, 57-93.
3. Barth, S., Melchinger, A. E. & Luebberestedt, T. (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., Berg, M. L. & Messersmith, C. G. (2002). An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome*, 45, 1049–1056.
5. De´lye C., Wang, T. & Darmency, H. (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.
6. De´lye C., Mate´jicek, A. & 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 Management Science*, 58, 474-47.
7. De´lye, C. & Michel, S. (2005). 'Universal' primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acethyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research*, 45, 323-330.
8. De´lye, C., Straub, C., Michel, S. & Corre, V. L. (2004). Nucleotide variability atthe 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.
9. De´lye, C., Calmes, E. & Mate´jicek, A. (2002). SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) genotypes resistance to acetyl-CoA carboxylaseinhibiting herbicides. *Theory and Applied Genetic*, 104, 1114-1120.

10. De´lye, C., Zhang, X. Q., Michel, S., Mate´jicek, A. & Powles, S. B. (2005). Molecular bases for sensivity to acetyl-coenzyme a carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, 137, 794-806.
11. Doyle, J. J. & J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19, 11-15.
12. Fraga, M. I. & Tasende, M. G. (2003). Mechanisms of resistance to simazinein *Sonchus oleraceus*. *Weed Research*, 43, 333-340.
13. Kaundun, S. S. & Windass, J. D. (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*, 6, 34-39.
14. Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. & Pepper, A. E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal*, 14, 387-392.
15. Preston, C. (2004). Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. *Weed Science*, 52, 448-453.
16. Rastgou, M., Rashed mohassel, M. H. & Mahallati, M. N. (2008). Detecting of *Avena ludoviciana* resistant to aryloxyphenoxypropionate herbicides in wheat fields of Khuzestan province. *2st Iranian Weed Science congress*. 481-485. (In Farsi).
17. Reade, J. P. H., Milner, L. J. & Cobb, A. H. (2004). A role for glutathione Stransferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science*, 52, 468-474.
18. White, G. M., Moss, S. R. & Karp, A. (2005). Differences in the molecular basis of resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim in *Lolium multiflorum*. *Weed Research*, 45, 440–448.
19. Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R. & Gornicki, P. (2001). An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acethyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. In: Proceeding of *the Nationa Academy of Sciences of the USA*, 98, 6617-6622.
20. Zand, E., Atri, A., Baghestani, M. A., Dastaran, F. & Pourbaig, M. (2008). Resistance of rye grass (*Lolium rigidium* L.) biotypes to clodinafob propargil herbicide in Fars province. *Jornal of weed Research*. 2, 125-134. (In Farsi).
21. Zhang, X.-Qi. & Powles, S. B. (2006). The molecular bases for resistance toacethyl co-enzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides in two targetbased resistant biotypes of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Planta*, 223, 550-557.