

## مطالعه ژنتیکی و مولکولی مقاومت علف‌هرز خردل وحشی (*Sinapis arvensis*) به علف‌کش بازدارنده استولاکتات سینتاز

### Genetic and molecular study of resistance in weed wild mustard (*Sinapis arvensis*) to acetolactate synthase inhibitor herbicide

روژین خالدی<sup>۱</sup>، فرزاد فیاض<sup>۱</sup>، دانیال کهریزی<sup>۲\*</sup>، رضا طالبی<sup>۱</sup>

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استادیار، استادیار، گروه اصلاح نباتات، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

Khaledi R<sup>1</sup>, Fayaz F<sup>1</sup>, Kahrizi D<sup>\*2</sup>, Talebi R<sup>1</sup>

1- Graduated PhD Student, Assistance Professor, Assistance Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran

2- Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Razi University, Kermanshah, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dkahrizi@razi.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۲/۱۹)

#### چکیده

علف‌های هرز از جمله خردل وحشی یک مسئله جدی در تولید محصولات زراعی هستند. مقاومت به علف‌کش‌ها در علف‌های هرز و خردل وحشی به یک تهدید متداول در کشاورزی تبدیل شده است و امنیت غذای جهانی را به خطر انداخته است. در این آزمایش ژن ALS علف‌هرز خردل وحشی مشکوک به مقاومت ناشی از غربال مزرعه‌ای و روش‌های مبتنی بر PCR از مزارع گندم استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت. سپس ژن *ALS* شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شد. برای این منظور با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه NCBI، پرایمرهای مناسب طراحی و با RT-PCR توالی ژنی مذکور تکثیر و به منظور توالی‌یابی در وکتور pTZ57R/T درون باکتری *E. coli* سویه *DH5α* همسانه‌سازی شد. براساس نتایج مولکولی مبتنی بر PCR، تعداد شش بیوتیپ، جهش در جایگاه هدف را نشان دادند. نتایج توالی‌یابی براساس روش مبتنی بر PCR، جهش‌های نوکلئوتیدی Asp376-Gly (GAC به GAG)، Pro197-Ser (CCT به TCT)، Trp574-Leu (TTG به TTG) و Ala122-Thr (GCA به ACA) در شش بیوتیپ را تایید نمود. این جایگاه‌های جهش توسط روش توالی‌یابی تایید شد. براساس نتایج این تحقیق مقاومت به علف‌کش در گیاه خردل وحشی می‌تواند به دلیل مقاومت در جایگاه هدف به دلیل جهش‌های نوکلئوتیدی مذکور در جایگاه فعال آنزیم، محل اتصال علف‌کش‌های بازدارنده ALS و خانواده آن باشد، یا به دلیل مقاومت جایگاه هدف که با تغییرات کنفورماسیونی می‌تواند باعث تغییراتی در سطح جایگاه واکنش پروتئین با علف‌کش و در نتیجه تغییر در میزان فعالیت و اتصال آنزیم- علف‌کش شود. این بدان معنی است که سطح مولکولی آنزیم نوع موتانت، کمتر در معرض تماس با علف‌کش قرار می‌گیرند و علف‌کش نمی‌تواند آنزیم را از فعالیت باز دارد و باعث ایجاد مقاومت در برابر علف‌کش می‌شود.

#### واژه‌های کلیدی

جهش نوکلئوتیدی

خردل وحشی

روش مبتنی بر PCR

مقاومت به علف‌کش بازدارنده ALS

مزوسولفورون متیل، سولفوسولفورون و تریبنورون متیل) در استان‌های گلستان، خوزستان، فارس و کرمانشاه گزارش شد. در این شهرها عموماً از علف‌کش‌های یکسان و مشابه با مقدار بالا به صورت مکرر در سیستم زراعی تک کشت یا تناوب زراعی محدود استفاده شده است (Heap 2020; Nosratti et al. 2020). عوامل مختلفی بر تکامل مقاومت به علف‌کش در علف‌های هرز مؤثر هستند که شامل جهش ژن، فراوانی اولیه آلل‌های مقاومت، توارث، شایستگی در حضور و عدم حضور علف‌کش، روش گرده افشانی و جریان ژن می‌باشند. در صورت شدید بودن آلودگی به علف‌هرز، حتی اگر نرخ جهش نیز پایین باشد، احتمال گزینش برای مقاومت بالاست. گسترش مقاومت به علف‌کش در علف‌های هرز، فرآیندی تکاملی است. در اثر تیمار مکرر با یک خانواده خاص از علف‌کش‌ها، ترکیب ژنتیکی جمعیت‌های علف‌هرز و یا به عبارتی فراوانی آلل‌های مقاومت تغییر کرده و افراد مقاوم زیاد می‌شوند. به این طریق جمعیت علف‌های هرز نسبت به فشار گزینشی ناشی از مصرف علف‌کش سازگار می‌شوند. فشار گزینشی یک ویژگی خاص در تکامل مقاومت به علف‌کش در علف‌های هرز نسبت به سایر فرایندهای تکاملی است. اگر تنوع ژنتیکی مقاومت بدلیل جریان ژن یا جهش باشد، در این صورت در فراوانی‌های بسیار کم نیز حتی مصرف مکرر علف‌کش افزایش سریع فراوانی گیاهان مقاوم را منجر شده و سرانجام جمعیت گیاهان مقاوم غالب می‌شود (Zand and Baghestani 2008).

از آن‌جا که علف‌کش‌ها با توانایی بالا علف‌های هرز را کنترل می‌کنند، مدل‌های ریاضی بیانگر آن است که فشار گزینش حاصل از علف‌کش‌ها، مهم‌ترین عامل تأثیرگذار سرعت توسعه مقاومت به علف‌کش در جمعیت علف‌هرز است. چندین ویژگی در علف‌کش‌ها و نحوه استفاده به‌منظور افزایش کارایی آن‌ها برای کنترل علف‌های هرز وجود دارد که عبارتند از: محل هدف آن‌ها، فعالیت طولانی مدت بقایای آن‌ها در خاک، اختصاصی بودن مکانیسم عمل آن‌ها، و تعداد دفعات استفاده آن‌ها (Zand and Baghestani 2008).

مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش بازدارنده ALS به دو نوع جهش جایگاه هدف و جایگاه غیرهدف اتفاق می‌افتد. مقاومت

فعالیت‌های بشری در قالب کشاورزی تعادل موجود در بوم نظام‌های طبیعی را به هم زده و باعث معرفی و سرایت علف‌های هرز و گیاهان مهاجم شده و این امر سبب ایجاد مشکلات جدی در تولید گیاهان زراعی شده است (Di Tomaso. 2000; Radosevich et al. 2003). علف‌های هرز مسئله ساز و در حال توسعه به یکی از چالش‌های مدیریت علف‌های هرز تبدیل شده‌اند (Nezamabadi et al. 2005). به نحوی که مطالعات نشان داد میانگین خسارت ناشی از رقابت علف‌های هرز در مزارع گندم ایران حدوداً ۳۰٪ است (Nosratti et al. 2020). لذا از آن‌جا که در گندم عملیات وجین معمول نبوده و روش‌های مکانیکی مبارزه با علف‌های هرز کارایی ندارند، لذا برای مدیریت علف‌های هرز باید از روش‌های پیشگیری، زراعی و شیمیایی استفاده کرد (Zand et al. 2008).

توسعه مقاومت به علف‌کش‌ها، نمونه برجسته‌ای از عمل تکامل گیاهان است. در پاسخ به کاربرد مکرر یک کلاس یا یک خانواده خاص از علف‌کش، ژنتیک جمعیت علف‌های هرز به سمتی تغییر خواهد کرد که فراوانی آلل‌های مقاومت و مقاومت فردی افزایش یابد. به این ترتیب، توسعه استراتژی برای جلوگیری و مدیریت مقاومت علف‌کش باید با تلفیق علم بیولوژی تکامل و جمعیت در علم علف‌های هرز همراه شود (Delye et al. 2014).

در کشاورزی قدیم، کنترل علف‌های هرز یک کار مشکل و در عین حال با اثر متوسط بود، تا وقتی که در اواخر دهه ۱۹۴۰ اولین علف‌کش‌ها راهی بازار شدند. علف‌کش‌ها تا به امروز مؤثرترین و کاربردی‌ترین روش جهت کنترل علف‌های هرز بوده‌اند که حدود ۹۰ تا ۹۹٪ علف‌های هرز هدف را کنترل می‌کنند. تا سال ۲۰۱۹ حدود ۵۱۰ گونه علف‌هرز مقاوم به علف‌کش گزارش شده است. امروزه معلوم گردیده که ۱۶۵ گونه علف‌هرز مقاوم به بازدارنده‌های ALS شناسایی شده است. اولین گونه مقاوم به این گروه بازدارنده در سال ۱۹۸۲ شناسایی شد. اولین خردل وحشی مقاوم به علف‌کش بازدارنده ALS در سال ۱۹۹۶ به علف‌کش کلروسولفورون در استرالیا مشاهده شد. در ایران برای اولین بار در مزارع گندم زمستانه در سال ۲۰۰۹ خردل وحشی مقاوم به علف‌کش‌های خانواده ALS (یدوسولفورون متیل سدیم،

خالدی و همکاران (Khaledi et al. 2019)، برای توالی‌یابی جهت بررسی و تأیید شش جایگاه آمینواسیدی جهش یافته ایجاد کننده مقاومت به ALS براساس آراییدوپسیس و خردل وحشی در جایگاه فعال و مورد هدف علف‌کش مورد بررسی قرار گرفت. این بیوتیپ‌ها با روش مبتنی بر PCR مشکوک به مقاومت به علف‌کش بازدارنده ALS می‌باشند. مراحل انجام آزمایش به شرح ذیل می‌باشد:

نمونه DNA ژنومی از بافت برگ‌گی بیوتیپ‌های مقاوم و حساس گزارش شده با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit, Germany) به روش ذکر شده در کیت انجام شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص DNA از روش بیوفتومتری (Germany, AG Eppendorf) و الکتروفورز افقی (USA, powerpac RAD-BIO) روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد (Sambrook and Russell 2001).

طراحی پرایمر توسط این تیم تحقیقاتی انجام شد. قطعه مورد نظر از ژن ALS در بیوتیپ‌های مقاوم با استفاده از آغازگرهای پیش‌رونده جایگاه ۱۱۶ (FW116) و پس‌رونده جایگاه ۶۶۷ (RW667) (جدول ۱) با واکنش PCR تکثیر شد که انتظار تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۶۵۶ جفت باز می‌رفت. مواد و شرایط واکنش PCR به ترتیب در جدول ۲ و جدول ۳ ارائه شده است. پس از انجام ۳۵ چرخه PCR و قبل از ورود به مرحله گسترش نهایی، مخلوطی از آنزیم Taq، dATP و بافر به واکنش تکثیر ژن ALS اضافه شد. هدف از این کار افزودن نوکلئوتید A به انتهای قطعات تکثیر شده ژن ALS بود. به علت اینکه آنزیم Pfu قطعاتی با انتهای صاف تولید می‌کند برای هم‌سازسازی قطعات تکثیری با این آنزیم به صورت T/A، اضافه کردن نوکلئوتید A به انتهای قطعات ضروری است.

جایگاه هدف به بازدارنده ALS در نتیجه کاهش میل ترکیبی علف‌کش نسبت به آنزیم ALS حادث می‌شود (Saari et al. 1994)، همچنین گزارش‌هایی در رابطه با مقاومت ALS توسط مکانیسم جایگاه غیر هدف وجود دارد (Heap 2020). مقاومت جایگاه هدف توسط جهش تک نقطه‌ای در ژن ALS ایجاد می‌شود. موقعیت‌های گزارش شده در علف‌دم‌روباهی به‌عنوان گیاه مدل به مراتب شامل جهش‌های Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Trp574, Ser653 (Tranel and Wright 2002)، Whaley et al. 2007; Warwick et al. 2008; Ashigh et al. 2009)، Arg377 (Massa et al. 2011) و Gly654 (Laplante et al. 2009) می‌باشد. برخی از جایگزینی‌های آمینواسیدی در ژن ALS منجر به مقاومت در برابر علف‌کش‌های مهار کننده ALS می‌شود. این جهش‌های خاص باعث کاهش کارایی علف‌کش برای اتصال به آنزیم جهش یافته و در نتیجه باعث بروز مقاومت می‌شود (Devine and Preston 2000). به‌طور ویژه، علف‌کش‌های مهار کننده ALS، از زمان ظهور آن‌ها در بازار توسط کشاورزان مورد استفاده قرار گرفته و یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل علف‌های هرز محسوب می‌شود (Jhala et al. 2017). با توجه به مسئله مقاومت علف‌های هرز از جمله خردل وحشی در مزارع گندم، هدف از این پژوهش مطالعه جهش‌های نوکلئوتیدی درگیر در مقاومت به علف‌کش در جایگاه فعال ژن ALS گیاه خردل وحشی به بازدارنده‌های ALS می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۷ بیوتیپ خردل وحشی (شش بیوتیپ مشکوک به مقاومت به روش مبتنی بر PCR و یک نمونه حساس از این گیاه به‌عنوان شاهد) گزارش شده توسط این تیم تحقیقاتی یعنی

جدول ۱- جفت پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن ALS در ژنوم DNA گیاه خردل وحشی

| پرایمر | توالی ۵' به ۳'                | Tm (°C) | طول قطعه تکثیری (نوکلئوتید) |
|--------|-------------------------------|---------|-----------------------------|
| FW116  | CGCTTACCCAGGAGGTGCATCCATG     | 69      | 1656                        |
| RW667  | GTGCGACCATCCCCTTCTGTTATGACATC | 68      |                             |

F: پرایمر پیش‌رونده، R: پرایمر پس‌رونده، W: تیپ وحشی، T، A، C و G: نوکلئوتیدها

جدول ۲- اجزاء و مقادیر واکنش PCR

| مقادیر        | اجزاء واکنش                     |
|---------------|---------------------------------|
| 2.5 $\mu$ l   | Buffer (10X)                    |
| 0.5 $\mu$ l   | dNTPs (10 mM)                   |
| 1 $\mu$ l     | Forward primer (10 pm/ $\mu$ l) |
| 1 $\mu$ l     | Reverse primer (10 pm/ $\mu$ l) |
| 0.5 $\mu$ l   | Pfu (2.5 u/ $\mu$ l)            |
| 1 $\mu$ l     | Template (100 ng/ $\mu$ l)      |
| to 25 $\mu$ l | Water                           |

جدول ۳- شرایط دمایی واکنش PCR ژن ALS

| مدت     | دما (درجه سانتی گراد) | مرحله واکنش          |
|---------|-----------------------|----------------------|
| 5 min   | 95                    | Initial denaturation |
| 30 sec  | 95                    | Denaturation         |
| 30 sec  | 58                    | Annealing            |
| 120 sec | 72                    | Extention            |
| 30 min  | 72                    | Final extention      |

استخراج شده توسط دو آنزیم، برش داده شدند. آنزیم‌های *NcoI* و *BglIII* برای برش دوتایی پلاسمید استفاده شدند. برش با این آنزیم‌ها دو قطعه مورد انتظار ۳۱۳۶ و ۱۴۱۹ نوکلئوتیدی حاصل می‌شود.

پس از انجام واکنش کلونی PCR، کلونی‌های مثبت حاوی قطعات ژنی مختلف به صورت جداگانه در حجم ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند و پس از گذشت یک شبانه روز از کشت‌های باکتریایی با استفاده از کیت GeneJET شرکت Thermo Fisher Scientific استخراج پلاسمید انجام شد.

### نتایج و بحث

غریبال مولکولی مبتنی بر PCR

در این تحقیق بیوتیپ شماره ۹ در موقعیت ۳۷۶ (Asp376-Gly)، GAC به GAG)، بیوتیپ‌های ۱۴ و ۱۹ در موقعیت ۱۹۷ (Pro197-Ser، CCT به TCT)، بیوتیپ‌های ۱۷، ۲۳ و ۲۸ در موقعیت ۵۷۴ (Trp574-Leu، TGG به TTG) و بیوتیپ شماره ۲۳ در موقعیت ۱۲۲ (Ala122-Thr، GCA به ACA) جهش را نشان دادند. سایر بیوتیپ‌ها که مقاومت آن‌ها از نوع جهش در جایگاه هدف نبود، احتمالاً به دلیل مقاومت در جایگاه غیر هدف می‌باشند. غریبال مولکولی مبتنی بر PCR براساس پرایمرهای ویژه گزارش قبلی این تیم تحقیقاتی (Khaledi et al. 2019)، که شش بیوتیپ را به عنوان بیوتیپ‌های جهش یافته معرفی نمودند، بود.

قطعات تکثیری دنباله دار شده ژن *ALS* روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. قطعه مورد نظر توسط کیت خالص‌سازی GeneJET شرکت Thermo Fisher Scientific بر اساس دستورالعمل خالص‌سازی قطعات از ژل با استفاده از کیت مذکور خالص‌سازی شد.

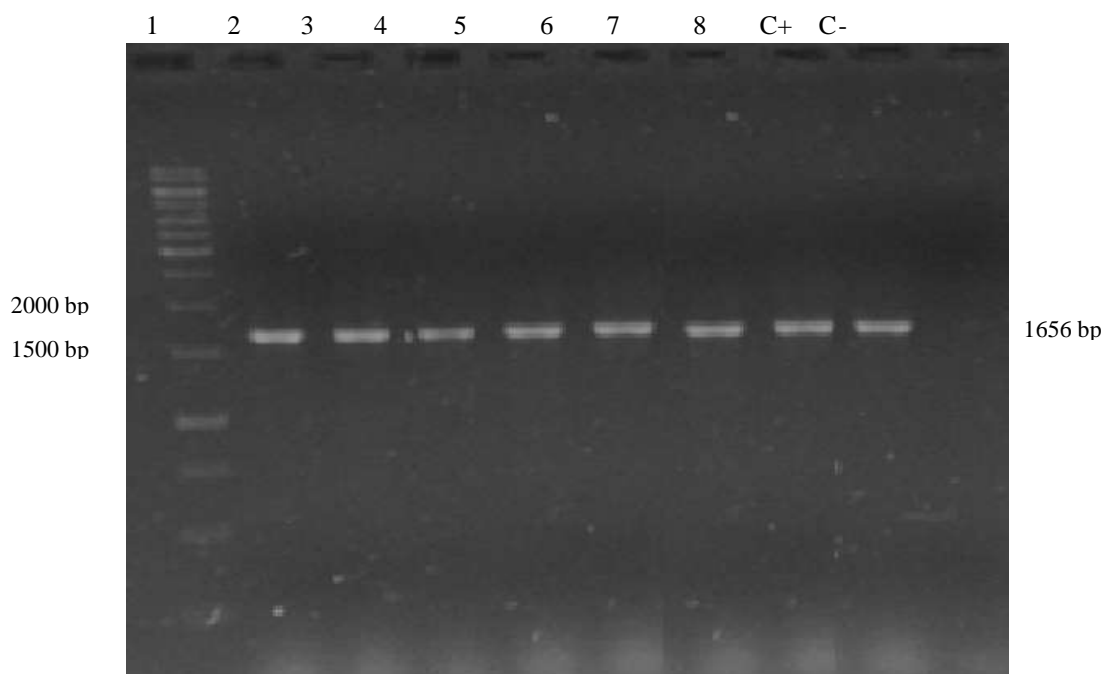
ناقل همسانه‌سازی pTZ57R/T، ناقلی دارای طول ۲۸۸۷ نوکلئوتید است. به صورت خطی بوده و انتهای ۵' آن دارای یک نوکلئوتید تیمین اضافه است. این نوکلئوتید تیمین امکان کلون سازی در این پلاسمید با استراتژی TA کلونینگ را فراهم می‌کند. پلاسمید pTZ57R/T دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است و از یک ناحیه آغاز همانندسازی مشتق از پلاسمید *ColEI* استفاده می‌کند که به دلیل حذف عوامل مهار کننده همانندسازی دارای تعداد کپی بسیار بالایی است. همچنین این پلاسمید دارای *f1 ori* مشتق از باکتریوفاژ *f1* است تا در صورت لزوم از قطعات کلون شده بتوان DNA رشته‌ای تولید کرد. قسمت MCS پلاسمید دارای یک توالی کد دهنده به دمن *LacZa* تغییر یافته است که حاوی چندین جایگاه برشی (در دو طرف محل کلونینگ محصول PCR)، توالی‌های هدف پرایمرهای *M13* و توالی پروموتور *T7* می‌باشد. بیان ژن *LacZa* توسط پروموتور *Lac* کنترل می‌شود. می‌توان از این پروموتور و یا *T7* پروموتور برای بیان ژن‌های نوترکیب نیز استفاده کرد.

در آخرین مرحله قبل از ارسال نمونه‌ها برای توالی‌یابی، جهت اطمینان بیشتر نسبت به صحت کلون‌های نوترکیب، پلاسمیدهای

به دلیل افزایش طول، نسبت به پلاسمید غیر نوترکیب در محل بالاتری از ژل قرار گرفتند، انتخاب شدند. بعد از ترنسفورماسیون، کلنی‌های سفید بر روی پلیت‌های چند خانه‌ای گسترش داده شده و با تست Quick-Check و سپس Colony-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تست باکتری‌ها مستقیماً در واکنش PCR به کار گرفته شدند (بدون تخلیص یا حتی استخراج DNA). برای تست Colony-PCR از پرایمرهای M13 که توالی هدف آن‌ها بر روی پلاسمید قرار دارد استفاده شده است به همین دلیل طول باند از محصول PCR مربوط به DNA ژنومیک اندازه بزرگ‌تری دارد. باکتری‌هایی که تست‌های غربالگری کلنی آبی-سفید، Quick-Check و Colony-PCR را پشت سر گذاشته‌اند، به صورت مایع کشت شده و از آن‌ها استخراج پلاسمید صورت گرفت. پلاسمیدهای استخراج شده برای بررسی Shift-Up بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. این تست مشابه Quick-Check است ولی فاقد بسیاری از خطاها و مشکلات Quick-Check بوده و دقت بالاتری دارد.

مکانیسم‌های مبتنی بر جایگاه غیر هدف شامل افزایش غیرسمی علف‌کش، کاهش جذب و انتقال و افزایش تجزیه شدن علف‌کش می‌باشد (Yuan et al. 2007). این نوع مقاومت خیلی کمتر از مقاومت مبتنی بر جایگاه هدف گزارش شده است و مکانیسم مولکولی آن کمتر شناخته شده است (Powles and Yu 2010).

همسازسازی و توالی‌یابی ژن *ALS* خردل وحشی قطعه مورد نظر از ژن *ALS* خردل وحشی، مربوط به بیوتیپ‌های شماره ۹، ۱۴، ۱۹، ۱۷، ۲۳ و ۲۸ به همراه بیوتیپ حساس (شاهد) با آغازگرهای پیش‌رونده (FW116) و پس‌رونده (RW667) (جدول ۱)، جهت همسازسازی در ناقل T/A تکثیر شد. نتایج حاصل از تکثیر، برای قطعه ژن *ALS* به طول ۱۶۵۶ جفت‌بازی در شکل ۱ ارائه شده است. واکنش‌های PCR توسط آنزیم *Taq* DNA پلیمرز در ۲۵ سیکل انجام شده است. بعد از ترنسفورماسیون، کلنی‌های سفید بر روی پلیت‌های چند خانه‌ای گسترش داده شده و با تست Quick-Check مورد بررسی قرار گرفتند. در این تست DNA باکتریایی آزاد شده و به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شدند. پلاسمید نوترکیب



شکل ۱- نتیجه PCR از DNA ژنومیک نمونه‌های شماره دو تا هشت.

چاهک ۱- مارکر 1kb، چاهک ۲، نمونه شاهد (حساس)، چاهک‌های ۳ تا ۸، محصول PCR از نمونه‌های موتانت شماره ۱ تا ۶، چاهک‌های C+ و C-، به ترتیب کنترل مثبت و کنترل منفی.

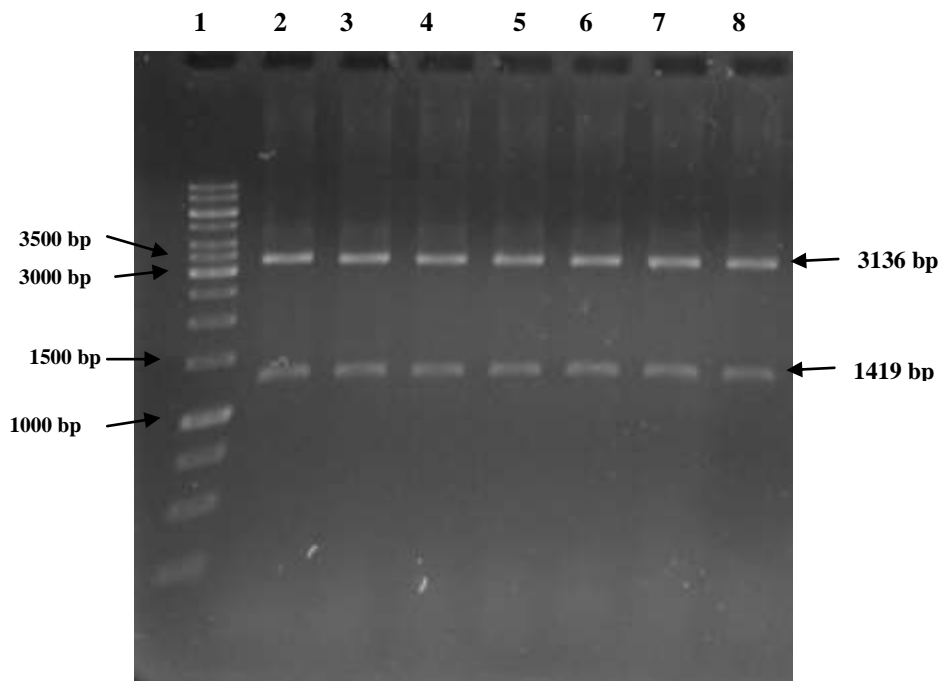
نتایج حاصل از توالی‌یابی بعد از توالی‌یابی، نمونه‌های موتانت و حساس با توالی نمونه خردل وحشی الگو مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از هر بیوتیپ به شرح ذیل می‌باشد.

بیوتیپ شماره ۹ علاوه بر جهش نقطه‌ای Asp376-Gly (GAC به GAG) و Thr457-Ala (ACG به GCG) و Lys500-Glu (AAG به GAG) را هم نشان دادند (جدول ۴). هر چند که جهش‌ها نوکلئوتیدی دیگر را نشان دادند که از نوع جهش‌های بی‌معنی بودند.

بیوتیپ‌های شماره ۱۴ و ۱۹ خردل وحشی مورد مطالعه با روش مبتنی بر PCR جهش Pro197-Ser (CCT به TCT) را نشان دادند. این جهش با روش توالی‌یابی در دو بیوتیپ مذکور مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر جهش جایگاه ۱۹۷، جهش‌های دیگری در هر بیوتیپ به‌دست آمد.

پلاسمیدهای سوپرکویل و حلقوی ممکن است در هر بار بارگذاری کردن بر روی ژل آگاروز بسته به متغیرهای مختلف در محل متفاوتی نسبت به باندهای مارکر DNA قرار بگیرند و با تکیه بر آن‌ها نمی‌توان اندازه پلاسمید را پیش‌بینی کرد. لذا از کلون‌هایی که تست‌های اولیه تأیید نوترکیبی را پشت سر گذاشته بودند استخراج پلاسمید صورت گرفت و سپس برای تعیین اندازه، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده توسط برش آنزیمی خطی شدند (قطعات خطی همواره متناسب با باندهای مارکر در ژل حرکت می‌کنند). برای خطی کردن پلاسمید از آنزیم برشی *NcoI* استفاده شده است.

جهت اطمینان از کلون‌های نوترکیب با آنزیم‌های *BglIII* و *NcoI* برش دو تایی پلاسمید انجام شد. برش با این آنزیم‌ها دو قطعه مورد انتظار ۳۱۳۶ و ۱۴۱۹ نوکلئوتیدی را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲- هضم دوگانه یا Double-Digest

چاهک ۱- مارکر 1kb، چاهک ۲: نمونه شاهد (حساس)، چاهک ۳ تا ۸: نتیجه برش دو تایی پلاسمیدهای نوترکیب به‌دست آمده از نمونه‌های جهش یافته ۱ تا ۶.

روش‌های مولکولی حاصل شد با روش توالی‌یابی هم مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این دو جهش مذکور، جهش آمینو اسیدی Ser290-Gly (AGT به GGT) نیز مشاهده شد (جدول ۴).

در جدول ۵ نقاط اسیدآمینه‌ای جهش یافته بیوتیپ‌ها را نشان داده شده است. در همه بیوتیپ‌های توالی‌یابی شده خردل وحشی علاوه بر جهش‌های Missense، جهش‌های نوکلئوتیدی دیگر را نشان دادند که از نوع جهش‌های خاموش (Silent) بودند در این نوع جهش تغییر یک کدون به جهت فزونی کد ژنتیکی همان اسیدآمینه، همان اسید آمینه را در پروتئین منجر می‌شود. اصطلاح Missense یک جهش نقطه‌ای است که باعث تغییر در یک کدون رمزکننده یک اسیدآمینه می‌شود و در نهایت به یک اسید آمینه‌ای دیگری تبدیل می‌شود (Kahrizi et al. 2007).

این تغییرات اسید آمینه که در توالی ژنوم ALS و در جایگاه فعال آنزیم بوجود می‌آید باعث تغییرات کنفورماسیونی در ساختارهای پروتئین می‌شود.

در بیوتیپ شماره ۱۴، جهش‌های Gly147-Arg (GGA به CGA) و Ser290-Gly (AGT به GGT) و در بیوتیپ شماره ۱۹، جهش‌های Gly147-Arg (GGA به CGA)، Val190-Ala (GTC به GCC) و Ser290-Gly (AGT به GGT) مشاهده شد (جدول ۴).

در بیوتیپ‌های شماره ۱۷ و ۲۸ خردل وحشی که با روش‌های مولکولی جهش Trp574-leu (TGG به TTG) گزارش شده بود، با روش توالی‌یابی این جهش را نشان دادند. این بیوتیپ‌ها علاوه بر جهش مذکور، جهش‌ها دیگری را نشان دادند. در بیوتیپ شماره ۱۷، جهش‌های Glu443-Asp (GAA به GAC) و His643-Arg (CAC به CGC) و در بیوتیپ شماره ۲۸، جهش‌های Phe161-Arg (CCG به CGG)، Asp185-Asn (GAC به AAC) و Ser287-Pro (TCT به TTC) مشاهده شد (جدول ۴). در بیوتیپ شماره ۲۳ خردل وحشی جهش‌های Ala122-Thr (GCA به ACA) و Trp574-leu (TGG به TTG) که با

جدول ۴- جهش‌های نقطه‌ای نشان داده شده حاصل از توالی‌های نمونه‌های خردل وحشی مورد مطالعه

| بیوتیپ شماره ۹  |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
|-----------------|-----------------|------------------|-----------|-----------------|------------------|----------|-------------------|------------------|
| ردیف            | نوکلئوتید طبیعی | نوکلئوتید موتانت | آمینواسید | آمینواسید طبیعی | آمینواسید موتانت | نوع جهش  | جایگاه نوکلئوتیدی | جایگاه آمینواسید |
| 1               | C               | G                | GAC-GGC   | Aspartic Acid   | Glycine          | Missense | 1127              | 376              |
| 2               | A               | G                | ACG-GCG   | Threonine       | Alanine          | Missense | 1369              | 457              |
| 3               | A               | G                | AAG-GAG   | Lysine          | Glutamic Acid    | Missense | 1498              | 500              |
| بیوتیپ شماره ۱۴ |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
| 1               | G               | C                | GGA-CGA   | Glycine         | Arginine         | Missense | 439               | 147              |
| 2               | C               | T                | CCT-TCT   | Proline         | Serine           | Missense | 589               | 197              |
| 3               | A               | G                | AGT-GGT   | Serine          | Glycine          | Missense | 868               | 290              |
| بیوتیپ شماره ۱۷ |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
| 1               | A               | C                | GAA-GAC   | Glutamic Acid   | Aspartic Acid    | Missense | 1329              | 443              |
| 2               | G               | T                | TGG-TTG   | Tryptophan      | Leucine          | Missense | 1721              | 574              |
| 3               | A               | G                | CAC-CGC   | Histidine       | Arginine         | Missense | 1928              | 643              |
| بیوتیپ شماره ۱۹ |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
| 1               | G               | C                | GGA-CGA   | Glycine         | Arginine         | Missense | 439               | 147              |
| 2               | T               | C                | GTC-GCC   | Valine          | Alanine          | Missense | 569               | 190              |
| 3               | C               | T                | CCT-TCT   | Proline         | Serine           | Missense | 589               | 197              |
| 4               | A               | G                | AGT-GGT   | Serine          | Glycine          | Missense | 868               | 290              |
| بیوتیپ شماره ۲۳ |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
| 1               | G               | A                | GCA-ACA   | Alanine         | Threonine        | Missense | 364               | 122              |
| 2               | A               | G                | AGT-GGT   | Serine          | Glycine          | Missense | 868               | 290              |
| 3               | G               | T                | TGG-TTG   | Tryptophan      | Leucine          | Missense | 1721              | 574              |
| بیوتیپ شماره ۲۸ |                 |                  |           |                 |                  |          |                   |                  |
| 1               | C               | G                | CCG-CGG   | Phenylalanine   | Arginine         | Missense | 482               | 161              |
| 2               | G               | A                | GAC-AAC   | Aspartic Acid   | Asparagine       | Missense | 553               | 185              |
| 3               | T               | C                | TCT-CCT   | Serine          | Proline          | Missense | 859               | 287              |
| 4               | G               | T                | TGG-TTG   | Tryptophan      | Leucine          | Missense | 1721              | 574              |

جدول ۵- آنالیز حاصل از توالی‌یابی، توالی‌های شش بیوتیپ موتانت (Biotype-9, Biotype-14, Biotype-17, Biotype-19, Biotype-23 و Biotype-28) به همراه بیوتیپ شاهد (Check-Biotype) و مقایسه آن با توالی هدف (FJ655877) خردل وحشی

| Majority      | Ala | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Ser | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|               | 122 | 147 | 161 | 184 | 190 | 197 | 287 | 290 | 376 | 443 | 457 | 500 | 574 | 643 |
| FJ655877      | Ala | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Ser | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | GCA | GGA | CCG | GAC | GTC | CCT | TCT | AGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TGG | CAC |
| Check-Biotype | Ala | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Ser | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | GCT | GGA | CCG | GAC | GTC | CCT | TCT | AGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TGG | CAC |
| Biotype-9     | Ala | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Ser | Glu | Glu | Ala | Glu | Trp | His |
|               | GCA | GGA | CCG | GAC | GTC | CCT | TCT | AGT | GAG | GAA | GCC | GAG | TGG | CAC |
| Biotype-14    | Ala | Arg | Pro | Asp | Val | Ser | Ser | Gly | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | GCA | CGA | CCG | GAC | GTC | TCT | TCT | GGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TGG | CAC |
| Biotype-17    | Ala | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Ser | Asp | Asp | Thr | Lys | Trp | Arg |
|               | GCA | GGA | CCG | GAC | GTC | CCT | TCT | AGT | GAC | GAC | ACG | AAG | TTG | CGC |
| Biotype-19    | Ala | Arg | Pro | Asp | Ala | Ser | Ser | Gly | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | GCA | CGA | CCG | GAC | GCC | TCT | TCT | GGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TGG | CAC |
| Biotype-23    | Thr | Gly | Pro | Asp | Val | Pro | Ser | Gly | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | ACA | GGA | CCG | GAC | GTC | CCT | TCT | GGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TTG | CAC |
| Biotype-28    | Ala | Gly | Arg | Asn | Val | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Thr | Lys | Trp | His |
|               | GCA | GGA | CGG | AAC | GTC | CCT | CCT | AGT | GAC | GAA | ACG | AAG | TTG | CAC |

شکل و سطح آنزیم می‌شود که این تغییرات می‌تواند باعث مقاومت به دلیل عدم اتصال علف‌کش بر روی آنزیم شود. (Choe et al. (2015) نشان دادند که جهش‌های نقطه Pro197-Ser یا Pro197-Ala، Thr تغییرات کنفورماسیونی قابل توجهی در پاکت اتصال بازدارنده ALS ایجاد کرده است. براساس پیشنهادات Zhang et al. (2004) ساختار ترکیبیات بازدارنده دمین کربوکسیل ترانسفراز ACCase یک تغییرات کنفورماسیون قابل توجهی در جایگاه فعال آنزیم ایجاد می‌کند که یک مجموعه اتصال بسیار حفاظت شده و بسیار آبرگیز ایجاد می‌کند که خیلی محکم به داخل دایمر متصل می‌شود. دو جایگاه Ile1871-Leu و Trp1738 در محل اتصال وجود دارند که حساسیت علف‌کش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و جهش در این جایگاه‌ها، ساختار دمین را مختل می‌کند. دیگر جایگاه‌ها محل اتصال به شدت در بین دمین‌های CT حفظ شده است.

تغییرات کنفورماسیونی در جایگاه هدف آنزیم می‌تواند باعث ایجاد مقاومت به علف‌کش شود. جهش در ساختار پروتئینی می‌تواند تغییراتی در ساختار پروتئین ایجاد کند که سطح دسترسی لیگاند بر روی رسپتور را محدود یا افزایش دهد، در نهایت در روند برهمکنش رسپتور-لیگاند دخیل است (Tehranchian et al. (2019; 2019). Casale et al. (2019) تغییراتی که در ساختار و کارکرد آنزیم در اثر جهش اتفاق می‌افتد لازم است بررسی شود. ضمناً لازم است که بررسی شود که علت اصلی مقاومت به علف‌کش به چه دلیلی است. در گزارشی توسط Akbarabadi et al. (2018) جهش‌های نوکلئوتیدی Ile1871-Leu و Ile2041-Asn در برابر بازدارنده‌های ACCase در گیاه یولاف وحشی را گزارش و بیان نمودند که این تغییرات آمینو اسیدی، اتصال علف‌کش بر روی آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین گزارش کردند که جهش‌های مذکور باعث تغییرات در

### منابع

Akbarabadi A, Ismaili A, Kahrizi D, Nazarian Firouzabadi F (2018) Resistance determination of the ACCase-inhibiting herbicide of clodinafop propargyl in *Avena ludoviciana* (Durieu), and study of their interaction using Molecular Docking and Simulation. *Molecular Biology Reports* 57:337-341.

Ashigh J, Corbett CL, Smith PJ, Laplante J, Tardif FJ (2009) Characterization and diagnostic tests of resistance to acetoxyacid synthase inhibitors due to an Asp 376 Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95:38-46.

Beckie HJ, Heap IM, Smeda RJ, Hall L (2000) Screening for herbicide resistance in weeds (Review). *Weed Technology* 14:428-445.

Casale FA, Giacomini DA, Tranel PJ (2019) Empirical investigation of mutation rate for herbicide resistance. *Weed Science* 67:361-368.

Choe M, Choe W, Lee I, Wu M, Liu S (2015) Computational analysis of mutated AHAS in response to sulfonyleurea herbicides. *Weed Research* 55: 359-369.

Delye C, Jasieniuk M, Corre VL (2014) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet* 11:649-58.

Devine M, Preston C (2000) The molecular basis of herbicide resistance. 72-104. Cobb, AH and RC Kirkwood herbicides and their mechanisms of action Sheffield, England Sheffield Academic Press Google Scholar.

- Di Tomaso (2000) Invasive weeds in rangelands: Species, impacts, and management. *Weed Science* 48:255-265.
- Heap I (2020) The International survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet. Sunday, January 19, 2020. Available [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).
- Jhala AJ, Sarangi D, Chahal P, Saxena A, Bagavathiannan M, Chauhan BS, Jha P (2017) Inter-specific gene flow from herbicide-tolerant crops to their wild relatives. In *Biology, Physiology and Molecular Biology of Weeds* CRC Press 87-122.
- Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Mousavi A, Moieni A (2007) Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Reports* 26:95-104.
- Kern AJ, Peterson DM, Miller EK, Colliver CC, Dyer WE (1996) Triallate resistance in *Avena fatua* L. is due to reduced herbicide activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56:163-173.
- Khaledi R, Fayaz F, Kahrizi D, Talebi R (2019) PCR-based identification of point mutation mediating acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in weed wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Molecular Biology Reports* 46:5113-5121.
- Laplante J, Rajcan I, Tardif FJ (2009) Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. *Theoretical and Applied Genetics* 119:577-585.
- Massa D, Krenz B, Gerhards R (2011) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research* 51:294-303.
- Nezamabadi N, Zand E, Maighany F (2005) Chemical control of some noxious weeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) fields in Iran. The 1st Iranian Weed Science Congress.
- Nosrati I, Sabeti P, Chaghmirzaee G, Heidari H. (2020) Weed problems, challenges, and opportunities in Iran. *Crop Protection*. 134:104371.
- Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61:317-347.
- Radosevich SR, Stubbs MM, Ghersa CM (2003) Plant invasions process and patterns. *Weed Science* 51:254-259.
- Saari LL, Cotterman JC, Thill DC (1994) Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Pages 83-139 in S. B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants, Biology, and Biochemistry*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1:628.
- Tehranchian P, Nandula K, Matzrafi M, Jasieniuk M (2019) Multiple herbicide resistance in California Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum): characterization of ALS-inhibiting herbicide resistance. *Weed Science* 67:273-280.
- Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS inhibitors: what have we learned? *Weed Science* 50:700-712.
- Warwick SI, Xu R, Sauder C, Beckie HJ (2008) Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant kochia (*Kochia scoparia*). *Weed Science* 56:797-806.
- Whaley CM, Wilson HP, Westwood JH (2007) A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS inhibitors. *Weed Science* 55:83-90.
- Yuan JS, Tranel PJ, Stewart CN (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12:6-13.
- Zand E, Baghestani MA (2007) *Weeds Resistance to herbicides*. Jahade Daneshgahi of Mashhad Press. (In Farsi).
- Zand E, Baghestani MA, Mousavi SK, Oveisi M, Ebrahimi M, Rastgoo M, Labbafi Hoseinabadi MR (2008) *Weed management guide*. Jahade Daneshgahi of Mashhad Press. (In Farsi).
- Zhang H, Tweel B, Tong L (2004) Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5910-5915.